

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchung des Promotors und der PU.1 abhängigen
Regulation des Stap-1 Gens in Mikrogliazellen und
Makrophagen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Claudia Harpaintner
2011

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Langmann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christian Hengstenberg

Tag der mündlichen Prüfung:

26.03.2012

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Retinoschisis	1
1.2 Immunabwehr im zentralen Nervensystem.....	3
1.3 Mikroglia.....	3
1.3.1 Rolle der Mikroglia in neurodegenerativen Erkrankungen	5
1.3.2 Mikroglia und retinale Degeneration	5
1.3.3 Mikroglia und CSF-1.....	6
1.4 Der Transkriptionsfaktor PU.1	7
1.5 Stem-cell adaptor protein-1 (Stap-1)	8
1.6 Zielsetzung der Arbeit	9
2. Material	11
2.1 Organismen und Zellen	11
2.2 DNA und Primer	11
2.3 Chemikalien, Kit-Systeme und Enzyme.....	12
2.4 Medien, Puffer und Lösungen	13
2.5 Verbrauchsmaterialien	14
2.6 Geräte.....	15
2.7 Software.....	16
3. Methoden	17
3.1 DNA	17
3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	17
3.1.2 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung und Analyse der DNA.....	18
3.1.3 Aufreinigen der DNA	18
3.1.4 Restriktionsverdau der DNA.....	19
3.1.5 Ligation	19
3.1.6 Hitzeschocktransformation mit kompetenten DH5 α – Zellen.....	20
3.1.7 DNA-Präparation.....	21
3.1.8 Kolonie-PCR	21
3.1.9 DNA-Konzentrationsbestimmung	22
3.1.10 Sequenzierung.....	22

3.1.11	Konservierung in Glycerinkulturen.....	23
3.1.12	Mutagenese	24
3.2	Zellkultur	25
3.2.1	Escherichia coli	25
3.2.2	Zelllinien RAW264.7 und BV2	25
3.3	Reportergen-Assay	26
3.3.1	Verwendete Konstrukte	26
3.3.2	Transiente Transfektion.....	27
3.3.3	Stabile Transfektion.....	29
3.3.4	Stimulation der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS).....	29
3.3.5	Lyse der transfizierten Zellen	30
3.3.6	Luciferase Assay	30
4.	Ergebnisse	31
4.1	Klonierung der Stap-1 Promotorkonstrukte.....	33
4.2	Mutation der Bindestellen des Transkriptionsfaktors PU.1.....	38
4.3	Transfektion	38
4.4	LPS-Stimulation	39
4.5	Luciferasemessung der 6 Promotorkonstrukte	39
4.5.1	Luciferasemessung in RAW264.7 Zellen	39
4.5.2	Luciferasemessung in BV2 Zellen	41
4.6	Stabile Transfektion.....	42
4.6.1	Ergebnisse der Luciferasemessung nach stabiler Transfektion	42
4.7	Klonierung neuer Promotorkonstrukte	43
4.7.1	Ergebnisse der Luciferasemessung mit den neuen Promotorkonstrukten	43
4.8	PU.1 Bindestellen-Mutation im Konstrukt -403/12	47
4.8.1	Luciferasemessung des mutierten Konstrukts	48
5.	Diskussion.....	53
5.1	Aktivität der an Position +187 endenden Konstrukte	53
5.2	Aktivität nach stabiler Transfektion	53
5.3	Aktivität der an Position -12 endenden Konstrukte	54
5.4	Einfluss der LPS-Stimulation	54
5.5	Einfluss der PU.1 Bindestellen-Mutation.....	55
6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	56
	Literaturverzeichnis	58
	Abkürzungsverzeichnis.....	61

Abbildungsverzeichnis.....	63
Tabellenverzeichnis.....	64

1. Einleitung

1.1 Retinoschisis

Retinoschisis ist eine Erkrankung des Auges mit einer primären Netzhautspaltung. Der Verlauf der Erkrankung ist individuell sehr unterschiedlich, Patienten leiden unter einer Sehinderung die über längere Zeit bis zur Erblindung fortschreitet. Man unterscheidet bei der Retinoschisis grundsätzlich zwei Formen: Zum einen gibt es die Retinoschisis als degenerative senile Form und zum anderen als X-chromosomal-rezessiv vererbte juvenile Form. Aufgrund dieses Erbgangs sind von der juvenilen Form nur Männer betroffen. Veränderungen sind vor allem im Bereich der Fovea centralis, das heißt im Bereich des schärfsten Sehens, zu finden. Die Sehschärfe verschlechtert sich durch eine vor allem zentral gelegene Netzhautspaltung. Die Erkrankung gehört zu den Makula Degenerationen. In der Makula, dem sogenannten „gelben Fleck“ im Zentrum der Retina, befinden sich hauptsächlich Zapfen. Die Makula ist die Zone der Netzhaut, mit der bei Tageslicht Farbsehen und scharfes Sehen möglich ist. Die Fovea centralis liegt im Zentrum der Makula. Sie ist gefäßfrei, grubenförmig eingesenkt und enthält nur Rezeptoren. Die Retinoschisis betrifft diesen Bereich der Netzhaut. Es zeigt sich histologisch eine Spaltung der retinalen Nervenfaserschicht. Anders ist dies bei der senilen Form, hier befindet sich die Spaltung in der äußeren plexiformen Schicht.

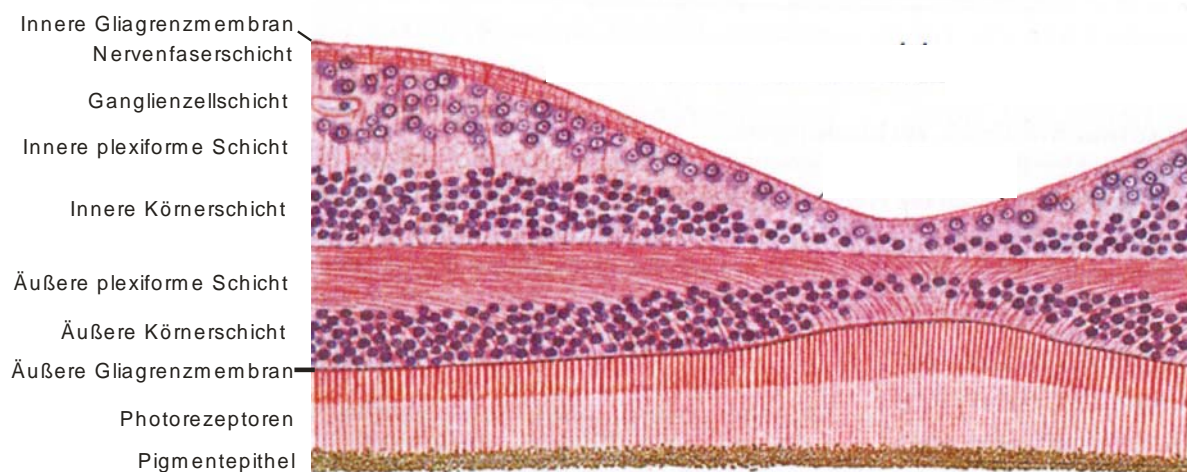


Abb. 1: Aufbau der Retina

Diese Abbildung zeigt den Aufbau der Retina (verändert nach Neuroanatomie, Trepel).

Die Manifestation der erblichen Retinoschisis ist sehr variabel. Manche Patienten zeigen eine minimale foveale Netzhautspaltung, andere entwickeln bereits in früher Kindheit eine Netzhautablösung in beiden Augen. Wenn eine Sehinderung eintritt, dann in der Regel im ersten Lebensjahrzehnt. Ohne das Auftreten von Komplikationen schreitet der Sehverlust jedoch mit zunehmendem Alter nicht fort. Mögliche Komplikationen sind Einblutungen in den Glaskörper oder Netzhautablösungen (Kellner, Brummer et al. 1990).

Durch mehrere Untersuchungen genetischer Kopplung wurde der RS Locus auf dem distalen kurzen Arm des X-Chromosoms kartiert (Weber, Janocha et al. 1995). Sauer, Gehrig et al. 1997 konnten zeigen, dass die erbliche Retinoschisis durch Mutationen im XLRS1 (X-linked Retinoschisis-1) Gen bedingt ist.

Um die Pathologie der Retinoschisis besser untersuchen zu können, wurde ein Mausmodell generiert, die sogenannte Rs1h-Knock-Out-Maus. Dieser Maus fehlt das murine orthologe Gen von RS1. Bei diesen Mäusen sind die Netzhautdefekte gleichmäßig über die Retina verteilt, ähneln aber funktionell sehr denen beim Menschen (Weber, Schrewe et al. 2002). Das RS1 Gen kodiert für das Protein Retinoschisin, das unter anderem in den retinalen Synapsen lokalisiert ist (Takada, Vijayasarathy et al. 2008).

1.2 Immunabwehr im zentralen Nervensystem

In der Pathologie der Retinoschisis spielen Mikroglia, die für die Immunabwehr des zentralen Nervensystems (ZNS) zuständig sind, eine wichtige Rolle. Gehirn und Retina unterscheiden sich von anderen Organen hinsichtlich der immunologischen Abwehr. Die Blut-Hirn-Schranke bewirkt, dass nicht alle bluteigenen Leukozyten in das ZNS übertreten können. Durch diesen Mechanismus ist das Gehirn vor einer möglicherweise schädlichen vollständig ausgeprägten Immunantwort geschützt. Neuronen sind fragile Zellen. Sie können vielen Toxinen, die von peripheren Leukozyten freigesetzt werden, nicht standhalten. Für die Erhaltung der neuronalen Funktion sind Gliazellen von großer Bedeutung. Gliazellen bilden ein Stützgerüst für die Neuronen. Sie sind für die elektrische Isolation und Homöostase im Gehirn verantwortlich. Zu den Gliazellen gehören Mikroglia, die zur Immunhomöostase beitragen (Streit 2002).

1.3 Mikroglia

Die Mikroglia- bzw. Hortege-Zellen entsprechen den in das ZNS eingewanderten Makrophagen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen Vorgängen im Gehirn, das aufgrund fehlender Lymphgefäße und fehlendem lymphatischem Gewebe immunologisch privilegiert ist (Trepel 2008). Mikroglia sind Teil der angeborenen Immunabwehr und sind für die neuronale Homöostase verantwortlich. Mikroglia gehören zu den Gliazellen. Unter dem Begriff Gliazellen werden verschiedene im Nervengewebe vorkommende Zellen, die keine Neuronen sind, zusammengefasst. Zu dieser Gruppe gehören im ZNS außer der Mikroglia die Neuroglia (Astrozyten, Oligodendrozyten) und die Radialglia. Im Gehirn befinden sich zehnmal so viele Gliazellen wie Neuronen. In der Retina befinden sich außer den Mikrogliazellen die sogenannten Müllerzellen, oder Müllerglia. Die Müllerzellen reichen von der innersten bis zur äußersten Schicht der Retina. Die Mikroglia stammen von der myeloischen Zellreihe ab und gelangen über das Blut in das Gehirn. Unklar ist bisher wann diese Einwanderung stattfindet. Direkte Vorgänger der Mikrogliazellen könnten Monozyten bzw. Makrophagen sein, da sie die wichtigsten Marker dieser Gruppe, FcR und CR3 (complement receptor III) exprimieren. Die

Mikroglia können verschiedene Morphologien zeigen, man unterscheidet eine amöboide Form von einer ramifizierten Form. Ruhende Mikroglia nehmen die ramifizierte Form an und können bei Aktivierung in die amöboide Form übergehen.

Hauptsächliche Funktion der Mikroglia ist die Immunhomöostase des Gehirns (Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2005). Eine wichtige Eigenschaft hierfür ist die Fähigkeit der Mikroglia zur Phagozytose. Während der Entwicklung des Gehirns werden apoptotische neuronale Zellkörper von Mikroglia abgeräumt. Außerdem können Mikrogliazellen durch endogene und exogene chemotaktische Faktoren angelockt werden und auf diese Weise an den Ort einer Infektion oder Verletzung wandern. In diesem Zusammenhang ist es sehr wichtig, dass es neben den aktivierenden Mechanismen auch inhibierende Mechanismen gibt, die eine überschießende Mikroglia Aktivierung verhindern. Ein wichtiger inhibitorischer Mechanismus ist die CD200 – CD200R Interaktion. Der CD200 Rezeptor (CD200R) wird in hohem Maß von Leukozyten der myeloischen Reihe, Mastzellen, Neutrophilen, dendritischen Zellen und T-Zellen exprimiert. Der Ligand CD200 ist ein Membranglykoprotein das zum Beispiel auf Lymphozyten, Neuronen und endothelialen Zellen vorkommt. Durch die Bindung von CD200 an den CD200R kann die Makrophagen Aktivierung limitiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Fehlen dieser Interaktion zu organspezifischen Autoimmunkrankheiten führen kann (Copland, Calder et al. 2007). Aktivierte Mikroglia bilden verschiedene Radikale wie Superoxid-Radikale oder NO. Mikroglia können TLR-vermittelt reguliert werden. TLR sind eine Klasse von Rezeptoren, die pathogen-assoziierte molekulare Muster wie LPS, unmethyliertes CpG oder endogene Aktivatoren wie Hitzeschockproteine oder extrazelluläre Matrixproteine erkennen und auf diese Weise zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort führen (Tambuyzer, Ponsaerts et al. 2009).

Auch an der Regeneration von Neuronen sind Mikroglia beteiligt. Geschädigte Neuronen können sich in der Gegenwart von aktivierten Mikrogliazellen erholen. Innerhalb von Stunden nach einer Verletzung wandern aktivierte Mikrogliazellen in das Gebiet ein und können dort wochenlang verbleiben. Bis zu diesem Zeitpunkt hat dann bereits eine gewisse Reinnervation stattgefunden (Streit 2002).

1.3.1 Rolle der Mikroglia in neurodegenerativen Erkrankungen

Wie oben bereits beschrieben, können Mikrogliazellen durch fehlgesteuerte oder übermäßige Aktivierung Schäden im Gewebe verursachen. Dies wird deutlich, da Mikroglia in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen eine zentrale Rolle einnehmen. Die wichtigsten Vertreter werden im Folgenden kurz beschrieben.

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Funktionsstörung, die durch drei pathologische Befunde charakterisiert wird. Zum Einen findet man neuritische Plaques, bestehend aus β -Amyloid Plaques, einem Degradationsprodukt des Amyloid Precursor Proteins (APP). Intrazellulär befinden sich Neurofibrillenbündel aus tau-Protein, zum Anderen wird eine Neuroinflammation durch Mikrogliose hervorgerufen. Bei der Mikrogliose sind die Immunzellen in hyperaktivierter Form und in enormer Anzahl im neuronalen Gewebe anzutreffen. Der Rückgang der kognitiven Fähigkeiten korreliert mit dem Untergang an Neuronen und Synapsen, verursacht durch diese Inflammation.

Die Rolle der Mikroglia bei der Entstehung von MS (Multipler Sklerose) ist umstritten. Mikroglia erkennt Myelin als Antigen, kann Myelin aufnehmen und präsentieren. Bisher konnte aber noch nicht gezeigt werden, dass dies ein Auslöser für MS ist.

Bei Morbus Parkinson kommt es zu einer Degeneration dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra. In der Substantia nigra von Parkinson Patienten findet man erhöhte Spiegel verschiedener Zytokine, die durch gesteigerte Mikroglia Aktivität entstehen.

Interessant ist auch, dass ein Drittel aller Zellen in Biopsien von Gliomen mikrogliale Marker exprimieren. Hier sind zwar Mikrogliazellen im Überfluss vorhanden, sie sind aber nicht mehr richtig funktionsfähig und zeigen zum Beispiel nach Stimulation keine MHC II Expression mehr (Tambuyzer, Ponsaerts et al. 2009).

1.3.2 Mikroglia und retinale Degeneration

Vermutlich führt die chronische mikrogliale Überaktivierung auch zur retinalen Degeneration, jedoch gibt es zu diesem Thema bisher wenige Daten. Die Erforschung der Funktionen der Mikroglia, besonders von Mikroglia inaktivierenden

Mechanismen ist besonders interessant, weil sich aus diesem Wissen Ansätze zur Therapie der oben genannten Krankheitsbilder ergeben können.

Nach dem Abschluss der Entwicklung ruhen die Mikroglia Zellen. Sie sind in der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Retina lokalisiert und zeigen eine ramifizierte Morphologie. Zytokine, die durch andere retinale Zellen ausgeschüttet werden, können diese ruhende Mikroglia aktivieren. Daraufhin proliferiert Mikroglia stärker, Migration und Phagozytose finden vermehrt statt und Mikroglia sezernieren verschiedene bioaktive Moleküle wie NO, IL-1 oder Caspasen. Neuronaler Zelltod kann durch diese aktivierte Mikroglia getriggert werden (Langmann 2007). Mehrere Studien zeigen, dass es bei erblich bedingter Degeneration der Photorezeptorzellen früh zu einer mikroglialen Aktivierung kommt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung dem apoptotischen Zelltod der Photorezeptorzellen vorangeht (Gehrig, Langmann et al. 2007). Mikroglia der Retina befinden sich in ständigem Wandel. Innerhalb von sechs Monaten wird die gesamte Population myeloischer Zellen der Retina ersetzt. Dabei gelangen Vorläuferzellen der Monozyten aus dem Knochenmark durch die Blut-Retina-Schranke und erneuern Mikroglia (Dick 2009).

1.3.3 Mikroglia und CSF-1

CSF-1 (colony-stimulating factor -1, oder auch genannt macrophage CSF) ist ein Hauptregulator für Überleben, Proliferation, Differenzierung und Funktion mononukleärer Phagozyten. Er spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität, bei entzündlichen Erkrankungen und Malignomen (Chitu and Stanley 2006). Im ZNS wird M-CSF von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia exprimiert, durch proinflammatorische Zytokine wird die Expression gesteigert. Der M-CSF-Rezeptor befindet sich ausschließlich auf Mikroglia. Eine Überexpression des M-CSF-Rezeptors führt zur Proliferation der Mikroglia und Expression proinflammatorischer Zytokine. Die gesteigerte Aktivität von Mikroglia in Anwesenheit von M-CSF führt zu einer höheren Phagozytoserate. Dieser Zusammenhang wurde besonders im Bezug auf die Phagozytose von β -Amyloid bei der Alzheimer-Krankheit untersucht (Mitrassinovic, Vincent et al. 2003). Die Effekte von CSF-1 werden von der

CSF-1 Rezeptor-Tyrosin-Kinase (CSF-1R) gesteuert. CSF-1R wird durch das c-fms Protoonkogen kodiert (Pixley and Stanley 2004). An der Regulation der c-fms Transkription ist der Transkriptionsfaktor PU.1 beteiligt (Hume, Yue et al. 1997).

1.4 Der Transkriptionsfaktor PU.1

PU.1 (purine rich box 1) ist ein sehr wichtiger Transkriptionsfaktor für die Hämatopoese und insbesondere für die Differenzierung von Makrophagen. Er gehört zur Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren. Zu dieser Familie gehören 29 Transkriptionsfaktoren, bisher ist davon PU.1 am besten untersucht. Ets-Transkriptionsfaktoren sind wichtige Effektoren des RAS-MAP-Kinase Signaltransduktionsweges im Zellkern. Sie führen je nach Typ zu Inhibierung oder Aktivierung der Transkription. Benannt ist diese Familie nach dem Vogel-Erythroblastose-Virus E26. Die konservierte Ets Domäne ist eine Variante des winged helix-turn-helix-motif, eine DNA-bindende Domäne die etwa 85 Aminosäuren umfasst. PU.1 bindet an Purin-reiche DNA-Sequenzen mit der Kernsequenz 5'-GGAA/T-3'. Die Mehrheit der PU.1 Bindestellen liegt in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes, in den meisten Fällen kurz davor, d.h. bis zu 500bp (Weigelt, Moehle et al. 2008).

Ohne PU.1 funktioniert die hämatopoetische Differenzierung nicht. Durch einen Mangel an PU.1 oder fehlende Funktion ist die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen gesteigert, was in Mensch und Mausmodellen zu Leukämie führt. Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors PU.1 wird besonders in Knock-Out Mäusen deutlich. Diese Mäuse bilden keine Makrophagen und zeigen eine gestörte Granulopoese sowie T-Zell-Reifung (Scott, Simon et al. 1994). Auch an der Transkription in Makrophagen ist PU.1 beteiligt. Der Transkriptionsfaktor reguliert unter anderem die Expression des M-CSF-Rezeptors (Hume, Yue et al. 1997). PU.1 unterliegt einer LPS-induzierten Phosphorylierung. Durch diese Phosphorylierung wird PU.1 weniger Protease-sensitiv, dadurch scheint die aktivierende Funktion von PU.1 gesteigert zu werden (Lodie, Savedra et al. 1997) .

Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Funktion von PU.1 in Mikroglia. In aktivierten Mikroglia ist PU.1 hoch exprimiert. Dies konnte u.a. in retinalen Mikroglia aus der Rs1h-Knock-Out-Maus gezeigt werden (Weigelt, Ernst et al. 2007) .

1.5 Stem-cell adaptor protein-1 (Stap-1)

Ursprünglich wurde das Stap-1 Gen als Adaptorprotein identifiziert, das an der Sinaltransduktion des Stammzellfaktors (SCF) beteiligt ist. Aufgrund dieser Funktion erhielt das Gen seinen Namen stem-cell adaptor protein-1 (Masuhara, Nagao et al. 2000). Stap-1 besteht aus 297 Aminosäuren und besitzt zwei Domänen, eine Pleckstrin Homologie Domäne und eine SH2 (Scr-homology 2) Domäne. Stap-1 wird ausschließlich in Zellen exprimiert, die aus dem Knochenmark stammen.

Eine starke Expression von Stap-1 kann man in aktivierten Mikroglia finden. In Retinoschisin defizienten Mäusen (RS1h^{-y}), einem Mausmodell für die Retinoschisis, konnte dies nachgewiesen werden. Hier konnten besonders hohe mRNA Spiegel von Stap-1 und anderen immunregulatorischen Genen gefunden werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Stap-1 eine Rolle in proinflammatorischen Mikroglia spielt (Stoecker, Weigelt et al. 2009). Eine weitere Charakterisierung und Untersuchung der Stap-1 Expression ist daher interessant, weil Stap-1 möglicherweise ein Zielgen bzw. -protein ist, mit dem die Mikroglia Aktivierung kontrolliert werden kann. Durch Stimulation mit LPS, IFN- γ und CpG konnte die Stap-1 mRNA Menge noch erheblich gesteigert werden (Stoecker, Weigelt et al. 2009). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Stap-1 Expression typisch für eine proinflammatorische Aktivierung von Phagozyten ist.

Die vermehrte Expression von Stap-1 hat einen direkten Einfluß auf Zellmorphologie und Aktivierungsstatus von Mikrogliazellen. Die Zellen gehen bei vermehrter Stap-1 Expression von ihrer im ruhenden Zustand ramifizierten Form in runde Zellkörper über und bilden Cluster.

Außerdem kann Stap-1 die Zellmigration und eine M-CSF induzierte Chemotaxis blockieren. Stap-1 trägt somit möglicherweise dazu bei, dass aktivierte Mikrogliazellen am Ort der Infektion bzw. des Traumas etc. bleiben. Stap-1 steigert die Phagozytoseaktivität, NO-Sekretion und Neurotoxizität von Mikroglia. Diese

potentiell schädlichen Eigenschaften machen Stap-1 zu einem interessanten Ziel für die therapeutische Modulation der mikroglialen Aktivität. Dennoch ist Stap-1 bisher wenig untersucht (Stoecker, Weigelt et al. 2009).

Stap-1 zeigt eine starke Homologie (83% identisch) mit dem humanen Gen BRDG1 (BCR downstream signaling 1) (Yokohari, Yamashita et al. 2001). BRDG1 ist ebenfalls ein Adaptorprotein mit einer PH und einer SH2 Domäne. Es aktiviert nach Quervernetzung mit dem B-Zell-Rezeptor die Tec Kinase. Tec Kinasen findet man vorwiegend in hämatopoetischem Gewebe und sie sind vermutlich an der Bildung von Blutzellen beteiligt. Sie sind vor allem wichtig für die B-Zell-Reifung (Ohya, Kajigaya et al. 1999).

In seiner Funktion als Adaptorprotein bindet Stap-1 sowohl an c-kit, als auch an CSF-1, wie mittels Two-Hybrid Assay gezeigt werden konnte (Masuhara, Nagao et al. 2000). C- kit ist ein Protoonkogen und spielt eine Rolle in der Regulation der hämatopoetischen Stammzellproliferation und – differenzierung. C- kit bindet an die SH2-Domäne von Stap-1. In hämatopoetischen Stammzellen wird c-kit durch Stap-1 herunterreguliert, und durch den stem cell factor SCF aktiviert.

Ein dem Stap-1 ähnliches Protein ist Stap-2. Auch Stap-2 besitzt eine PH und eine SH2 Domäne. Stap-2 spielt eine Rolle in LPS-abhängiger Makrophagen Stimulation (Sekine, Yumioka et al. 2006). Stap-2 ist an der negativen Regulation von FAK (focal adhesion kinase) beteiligt. FAK ist eine ubiquitäre Kinase, eine genetische Ablation dieser Kinase führt zu früher embryonaler Letalität. Dieser Zusammenhang ist ein Hinweis, dass Stap-2 in einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Überleben, Proliferation und Motilität von Zellen eine Rolle spielt (Sekine, Tsuji et al. 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Langmann am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg befasst sich mit der Rolle der Mikroglia in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen. Zu diesen Krankheiten gehört die Retinoschisis. Zur Erforschung der Pathologie dieser Erkrankung wird ein Retinoschisis-Mausmodell verwendet. Mit der Arbeit von Gehrig, Langmann et al. (2007) konnte gezeigt werden, dass es möglicherweise durch eine Überaktivierung der Mikroglia

zur Apoptose in der Retinoschisin defizienten Retina kommt. Zu Beginn wurde eine Genexpressionsanalyse zum Vergleich Retinoschisin-defizienter Mäuse mit Wildtyp Mäusen durchgeführt. Man fand hier erhöhte mRNA Spiegel verschiedener Gene, unter diesen war auch Stap-1.

Ausgehend von diesem Ergebnis hat es sich die Arbeitsgruppe zur Aufgabe gemacht, Marker für die mikrogliale Aktivierung zu identifizieren und zu charakterisieren. Ziel ist es dadurch die Pathobiologie der Retinoschisis aufzuklären bzw. besser zu verstehen.

In dieser Doktorarbeit sollte der Promotor des Stap-1 Gens, welcher in aktivierter Mikroglia selbst auch aktiviert wird, untersucht werden.

Bereits bekannt war, dass sich in dem Promotor von Stap-1 zwei konservierte PU.1 Bindestellen befinden (Weigelt, Moehle et al. 2008).

Als erster Schritt sollten Promotorstücke unterschiedlicher Länge kloniert und die Promotoraktivität mittels Luciferase Assay untersucht werden. Diese Assays sollten zuerst in RAW264.7 Makrophagen und anschließend in BV2-Mikroglia durchgeführt werden. Zur Untersuchung des Einflusses der PU.1 Bindestellen sollten zusätzlich Klone mit mutierten PU.1 Bindestellen verwendet werden.

Zusätzlich sollten die Luciferase Assays mit LPS-Stimulation durchgeführt werden, da sich gezeigt hatte, dass unter dieser Stimulation die Stap-1 Expression induziert wird (Stoecker, Weigelt et al. 2009).

2. Material

2.1 Organismen und Zellen

In dieser Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Organismen und Zellen, sowie deren Eigenschaften und Herkunft aufgelistet.

Zelltyp	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
E. coli DH5 α	Siehe Appendix in Sambrook et al., 1989	Invitrogen / Sambrook et al., 1989
RAW 264.7	Zelllinie makrophagenähnlicher Tumor-Mauszellen, induziert mit Abelson murine leukemia virus	LGC Promochem / Raschke WC
BV2	Zelllinie mikrogliähnlicher Tumor-Mauszellen, induziert mit v-raf / vmyc onkogen tragendem Retrovirus (J2)	(Blasi, Barluzzi et al. 1990)

Tabelle 1: verwendete Organismen und Zellen

2.2 DNA und Primer

Genomische Maus DNA Nr. 803

Die Tabelle zeigt alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer, sowie die Sequenz der Primer und die Verwendung.

Name		Sequenz (5'-3')	Position	Verwendung
Stap1 Prom F1	forward	CCCCTCGAG ATGAAAGGAAGAACCGCAGA	-1149	Konstrukt PCR
Stap1 Prom F2	forward	CCCCTCGAG GCTTGAGCCCCACATATTA	-814	Konstrukt-PCR
Stap 1 Prom F3	forward	CCCCTCGAG TAGCCAATAGGATCAATACAAAA	-403	Konstrukt PCR
Stap1 Prom F4	forward	CCCCTCGAG TGGAAAGGGTTGGTGGTTAAA	-43	Konstrukt-PCR
Stap1 Prom R1	reverse	CCCAAGCTT TCAAAGTACAGGGGCAGAGC	+187	Konstrukt PCR
Stap1 Prom R2	reverse	CCCAAGCTT CCGTTTGACCACTAAAAATCCT	+199	Konstrukt-PCR
Stap1_Prom_Rnew	reverse	CCCAAGCTT GGAGTTTGCTTGCCTTCAG	-12	Konstrukt-PCR
RV3	forward	CTAGCAAAATAGGCTGTCC		Sequenzierung
GL2	reverse	CTTTATGTTTTTGCGCTCTTCC		Sequenzierung
stap1_mut1_pu.1_f	forward	TGGTTAAAAAGCGAGTTGAGACAACTCTTTGAACAGTTGCCTCTCC		Mutagenese
stap1_mut1_pu.1_r	reverse	GGAGAGGCAACTGTTCAAAGAGTTGTCTCAACTCGCTTTTAAACCA		Mutagenese
stap1_mut2_pu.1_f	forward	CCTGCCCTCGCAGGATCAAACAGGAAGACTGAAGATC		Mutagenese
stap1_mut2_pu.1_r	reverse	GATCTTCAGTCTTCTGTTGATCCTGCGAGGGGCAGG		Mutagenese

stap1_mut2_pu.1_f2	forward	AAACCTGCCCCCTCGCAGGATCAAACAGGAAAGACTGAAGATCACT	Mutagenese
Stap1_mut3_f	forwad	GTTAAAAAGCGAGTTGAGACTAACTCTTTGAACAGTTGCCTCTC	Mutagenese
Stap1_mut3_r	reverse	GAGAGGCAACTGTTCAAAGAGTTAGTCTAACTCGCTTTTAAAC	Mutagenese

Tabelle 2: verwendete Primer

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

Diese Tabelle beschreibt das in der Arbeit verwendete Plasmid.

Plasmid	Größe	Resistenz	Verwendung	Hersteller
pGL4.10[luc2]	4,2kb	Ampicillin	Luciferase-Assay	Promega

Tabelle 3: verwendetes Plasmid

2.3 Chemikalien, Kit-Systeme und Enzyme

Die Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Kit-Systeme und Enzyme. Enzyme die Komponenten eines Kit-Systems sind werden nicht extra aufgelistet.

Kits	Verwendung	Hersteller
TaqPCR Core Kit	PCR	Qiagen; Cat. No.:201225
Gel Extraction Kit Qiaexll	DNA-Aufreinigung	Qiagen; Cat. No.:20021
Fugene HD Transfection Kit	Transfektion	Roche; Lot. No.: 04709705001
TransIT-LT1 Transfection Reagent	Transfektion	Mirus; Mir 2305
Nucleo Spin Plasmid Mini Kit	DNA-Isolierung	Macherey-Nagel; 40588-50
Nucleo Bond Xtra Midi Kit	DNA-Isolierung	Macherey-Nagel; 740410-50
EndoFree Midi Präp		
Luciferase Assay System	Luciferase-Assay	Promega; E1501
BigDye Terminator Sequencing Kit	Sequenzierung	Perkin Elmer
QuikChange® Multi-Site-Directed Mutagenesis Kit	Mutagenese	Stratagene; 200516
BigDye Terminator Sequencing Kit	Sequenzierung	Perkin Elmer
Enzyme		
Restriktionsenzyme	Plasmid-, Konstruktverdau	NEB
T4 DNA Ligase	Ligation	NEB

Tabelle 4: verwendete Kit-Systeme und Enzyme

Die Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Verwendung	Hersteller
Biozym LE Agarose	Gelelektrophorese	Biozym; 840 004
Ethidiumbromid	Gelelektrophorese	Roth
1kB Plus DNA Ladder	Gelelektrophorese	Invitrogen; Cat. No.: 15615
Reporter Lysis 5* Buffer	Luciferase Assay	Promega,E3971
1kB-Leiter	Standard für Agarosegele	Invitrogen; Cat. No.:15615
Glycerin 30%	Kryopräservation	Chemikalienausgabe Uni Regensburg

Tabelle 5: verwendete Chemikalien

2.4 Medien, Puffer und Lösungen

In dieser Tabelle sind die für die Arbeit verwendeten Medien mit allen Zusätzen und ihre Anwendung beschrieben.

Medium	Zusätze	Anwendung	Hersteller
DMEM High Glucose (4,5g/L)	10%FCS, 1%Penicillin/ Streptomycin	Medium für RAW264.7	PAA; E15-810
RPML with L-Glutamine	5%FCS, 1%L-Glutamin, 1%Penicillin/ Streptomycin, 1,95µL β-Mercaptoethanol	Medium für BV2	PAA; E15-039
	fetales Kälber Serum (FCS)	Medium für RAW264. 7 und BV2	PAA; A15-151
	Penicillin/ Streptomycin		PAA; P11-010
	L-Glutamin (200mM)	Medium für BV2	PAA; M11-004
LB Platten und Flüssigmedium	Ampicillin	Selektion von DH5α	
SOC Flüssigmedium	Ampicillin	Inkubation von DH5α	Sigma; S1797

Tabelle 6: verwendete Medien

Die Tabelle zeigt die verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
10x PBS	verschieden	1,5 M NaCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM H ₂ PO ₄ x H ₂ O (pH7.4)
10x TBE	Gelelektrophorese	1M Tris; 1M Borsäure; 20mM EDTA (pH 7.5)
Agarosegel (1-2%)	Gelelektrophorese	1-2% (w / v) Agarose in 1x TBE-Puffer
10x DNA-Auftragspuffer	Agarosegele	Tris/HCl (pH7,5; 10mM); Sodium Acetat (5mM); EDTA (2mM); Glycerol (10%) Bromphenolblau; 0,001% (w/v) Xylencanol

Tabelle 7: verwendete Puffer und Lösungen

2.5 Verbrauchsmaterialien

Die Tabelle zeigt die wichtigsten verwendeten Verbrauchsmaterialien inklusive Verwendungszweck und Hersteller.

Material	Verwendung	Hersteller
BD Falcon 70 µM Cell Strainer	Mikroglia Präparation	BD Bioscience; 352350
1,5 mL Cups	verschieden	Sarstedt, No./REF 72.690.200
15 mL Falcon Tube	verschieden	Sarstedt; No./REF 62.554.502
50 mL Falcon Tube	verschieden	Sarstedt; No./REF 62.547.254
2 mL/5 mL/10 mL/25 mL/50 mL Pipetten	verschieden	Sarstedt
10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL Filterspitzen	verschieden	Sarstedt
2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL Pipetten	verschieden	Eppendorf
10µL, 100µL, 1000µL Pipettenspitzen	verschieden	Omnitip
Einmalhandschuhe	verschieden	Kimberly-Clark
Nitrilhandschuhe	verschieden	VWR International; Art-Nr. 112-2372
Greiner LIA Plate white 96-well	Luciferase Assay	Greiner; 65510196
PCR Cups	PCR	Brand Life Science Products; 781343
Zellschaber 25 cm	Zellkultur	Sarstedt; No./REF 83.1830
Multiwell 12-Well Plate	Zellkultur	Nunc™
Nunc™ Flasks 75 cm ² nunclon Δ-surface	Zellkultur	Nunc™; 178891

Tabelle 8: verwendete Verbrauchsmaterialien

2.6 Geräte

Die Tabelle gibt einen Überblick welche Geräte für die Arbeit genutzt wurden.

Gerät	Verwendung	Hersteller
Brutschrank CB 210	Zellkultur	Binder
Gelkammer Blue Marine 200	Gelelektrophorese	Blue Power
Gelkammer Mini Sub DNA Cell	Gelelektrophorese	BIORad
Biostep Dark Hood	Geldokumentation	Biostep; DH-30/32
FLUOstar Optima	Luciferase-Assay	BMG Labtech
Mikroskop DMIL HC kpl. Invers	verschieden	Leica
Mikrowelle Kor-6D07	verschieden	DAEWOO
Mikrozentrifuge	verschieden	Labnet
Netzgerät Blue Power Plus	Gelelektrophorese	Blue Power
NanoDrop	Konzentrationsbestimmung DNA	PeqLab
Mr. Frosty Gefriercontainer	Kryopräservation	Nalgene; Cat. No. 5100-0001
Sterilbank	Zellkultur	BDK Luft- & Reinraumtechnik GmbH
Thermocycler	PCR	Biometra
Thermomixer 5436	verschieden	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge fresco	verschieden	Heraeus
Vortex Genie 2 G-560E	verschieden	Scientific Industries
Wasserbad	verschieden	GFL
Zentrifuge	verschieden	Sigma
3130xl Genetic Analyzer	Sequenzierung	Applied Biosystems

Tabelle 9: genutzte Geräte

2.7 Software

In dieser Tabelle ist die genutzte Software aufgelistet.

Software	Verwendung	Hersteller/Webadresse
Argus 3.0	Geldokumentation	Argus
SigmaPlot	Luciferaseauswertung	www.sigmaplot.com
CorelDraw	Erstellen von Darstellungen	www.corel.com
Genomatix Online-Portal	Promotor-Vorhersage	http://www.genomatix.de
Primer 3	Primer-Design	http://frodo.wi.mit.edu/
QuikChange® Primer Design Program	Mutagenese-Primer-Design	http://www.stratagene.com/sdmdesigner/default.aspx
ClustalW2	Sequenzanalyse	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
Sequence Scanner 1.0	Sequenzanalyse	Applied Biosystems
Edit Seq 5.05	Sequenzanalyse	DNASTAR
SPSS16.0	Students t-test	www.spss.com

Tabelle 10: genutzte Software

3. Methoden

3.1 DNA

3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode um kleine Mengen an template DNA innerhalb kurzer Zeit zu amplifizieren. Dazu werden zur DNA Primer, hitzestabile Taq-Polymerase, freie Nukleotide und Puffer hinzugefügt.

Der Reaktionsansatz hat ein Gesamtvolumen von 50 µl und wurde folgendermaßen pipettiert:

5µl 10xPuffer

10µl Lösung Q

1µl dNTPs (10mM)

0,5µl Taq-DNA-Polymerase (5 Units/µl)

3µl genomische Maus DNA Nr. 803

28,5µl H₂O

48µl

+ 1 µl forward Primer 25µM

+ 1 µl reverse Primer 25µM

Zuerst wird die DNA auf 95°C erhitzt, wobei es zur Auftrennung in die Einzelstränge kommt. In der darauffolgenden Annealingphase lagern sich die Primer an die Einzelstränge. Während der Elongationsphase wird die DNA mit der Taq-Polymerase amplifiziert. Dieser Zyklus wird 35 mal wiederholt. Schließlich wird der Reaktionsansatz auf 4°C gekühlt.

Vordenaturierung	95°C 5min	
Denaturierung	95°C 40sec	} 35 Zyklen
Annealing	60°C 44sec	
Elongation	72°C 2min	
Finale Elongation	72°C 10min	
4°C hold		

Mit der hier beschriebenen Polymerase Kettenreaktion wurden 8 Promotorkonstrukte generiert.

Es wurden vier verschiedene Forward-Primer und zwei Reverse-Primer (siehe Tabelle 2) verwendet. Die Primer wurden mithilfe des Programms Primer 3 (siehe Tabelle 10) erstellt. Später wurde mit dem Reverse Primer weitergearbeitet, mit dem eine höhere PCR-Ausbeute erzielt werden konnte. Dies war Primer R1 (siehe Abb. 4).

3.1.2 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung und Analyse der DNA

Mittels der Agarosegelelektrophorese können DNA Fragmente nach der Größe aufgetrennt werden. Die DNA- Fragmente liegen als Polyanionen vor und bewegen sich im angelegten elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente wurden 0,7%, 1% oder 2% Agarose in einem entsprechenden Volumen TBE-Puffer + Ethidiumbromid durch Aufkochen gelöst.

Diese Lösung erstarrt beim Abkühlen in der Gelkammer (Firma Blue Power) innerhalb von 30-60 min. Als Laufpuffer wird ebenfalls 1x TBE-Puffer mit Ethidiumbromid verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel werden die zu analysierenden DNA-Proben noch mit 10x Auftragspuffer (Loading Dye) versetzt, damit die Proben besser in die Taschen des Gels absinken. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wird ein 1 kb-Größenstandard der Firma Invitrogen mit aufgetrennt. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei 80 bis 100 Volt mit einem Netzgerät der Firma Blue Power und dauert etwa 45-60 min.

Die DNA Banden werden anschließend mit der Dark Hood DH-30/32 der Firma Biostep und der dazugehörigen Argus 3.0-Software (siehe Tabelle 10) sichtbar gemacht, fotografiert und über einen Thermoprinter ausgedruckt.

3.1.3 Aufreinigen der DNA

Die Aufreinigung der DNA erfolgte je nach Bedarf aus dem vorherigen Reaktionsansatz oder aus dem Agarosegel.

Dazu wurde das Gel Extraction Kit Qiaex II der Firma Qiagen verwendet. Die Vorgehensweise richtete sich nach dem Handbuch. Eluiert wurde die DNA dann in 50µl.

3.1.4 Restriktionsverdau der DNA

Für den Restriktionsverdau der DNA verwendet man sogenannte Restriktionsendonukleasen. Dies sind Bakterien-Enzyme, welche DNA an bestimmten Positionen schneiden können.

Jede Restriktionsendonuklease erkennt eine spezifische DNA-Basensequenz.

Mit dem Programm webcutter wurden Restriktionsenzyme ermittelt, welche die gewünschte Promotorsequenz von Stap-1 nicht schneiden, aber in der multiple cloning site des pGL4.10 Vektors liegen. Die Analyse ergab die Restriktionsenzyme XhoI und HindIII. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme wurden in richtiger Orientierung an die Primer angefügt und diese bei der Firma Metabion bestellt.

Mit diesen Enzymen wurden sowohl die 4 Konstrukte als auch der Vektor pGL 4.10 geschnitten. Somit passten die Enden der Konstrukte jeweils zu denen des Vektors. Unter dieser Voraussetzung konnten die Konstrukte in den Vektor kloniert werden.

Alle verwendeten Enzyme und die dazugehörigen Restriktionspuffer lieferte die Firma NEB. Gemäß den vom Hersteller vorgegebenen Versuchsbedingungen wurden enzymatische Verdaue in einem Gesamtvolumen von 20 µl (Konstrukte) – 60 µl (Vektor) angesetzt.

Nach der Inkubation bei 37°C über 2 h wird der Restriktionsansatz durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.1.2) analysiert. Nach dem Verdau wird die DNA dann wie oben beschrieben (siehe 3.1.3) erneut aufgereinigt.

3.1.5 Ligation

Der 20µl Reaktionsansatz für die Ligation der vier Promotorkonstrukte mit dem Vektor pGL4.10 setzte sich wie folgt zusammen:

14,5µl Insert (= Konstrukte)

2µl Vektor pGL4.10

2µl 10x Ligationspuffer

1,5µl DNA Ligase T4 (400 000 Units/ml)

Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert.

3.1.6 Hitzeschocktransformation mit kompetenten DH5 α – Zellen

Mittels Hitzeschocktransformation kann DNA mit hoher Effizienz in kompetente Bakterienzellen (DH5α-E. coli) eingeschleust werden. Hierfür werden 100 µL DH5α-Bakterien für 5 min auf Eis aufgetaut, anschließend mit dem Ligationsansatz (siehe 3.1.5) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 90 sec bei 42°C im Wasserbad, wodurch die Zellwand der Bakterien permeabel für die einzuführende DNA wird. Die Zellen werden anschließend 5 min auf Eis abgekühlt um die Transformation abzuschließen. Zum Schluß werden die Zellen mit 1 mL SOC-Medium versetzt. Es folgt eine Inkubationsphase von 1 Std. bei 37°C im Schüttler bei 900 Umdrehungen pro Minute (rpm). Diese Inkubation dient der Regeneration der Zellen. 100 µl der transformierten Zellen werden anschließend auf Selektionsplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die restliche Zellsuspension wird bei 13.000 rpm für 3 min abzentrifugiert, der Überstand abgekippt und die dadurch konzentrierte Bakteriensuspension auf eine weitere Lb-amp-Platte ausplattiert. Die Selektionsplatten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen können gewachsene Kolonien gepickt werden.

Die gepickten Kolonien werden jeweils auf weiteren Lb-amp-Platten ausgestrichen, zugleich werden damit jeweils 1 ml Lb-amp Medium in einem Röhrchen beimpft.

Sowohl die Platten als auch die Röhrchen werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die ausgestrichenen Platten werden mit Parafilm verschlossen. Somit können die Klone für ein paar Wochen konserviert werden. Die Röhrchen werden für die anschließende DNA Präparation verwendet.

3.1.7 DNA-Präparation

Die DNA Präparation erfolgte, je nachdem welche Menge an DNA gewonnen werden sollte, mit verschiedenen Kits. Für eine kleine Menge DNA, eine sogenannte „Mini-Präp“ wird die DNA mit dem Nucleo Spin Plasmid Mini Kit aus den DH5 α – Flüssigkulturen isoliert. Die Plasmid-DNA wird in 50 μ l sterilem Wasser eluiert und bei -20°C gelagert. Für größere Mengen wurde eine „Midi-Präp“ durchgeführt. Mit dem Nucleo Bond Xtra Midi Kit wird die DNA aus einer 500ml Lb-amp-ÜN-Flüssigkultur isoliert. Die DNA wird in 100-200 μ l sterilem Wasser aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Für die nach der Transfektion erfolgende LPS Stimulation ist es notwendig Endotoxin freie DNA zu benutzen. Die Präparation dieser EndoFree Midi Präp erfolgte nach dem Handbuch des EndoFree Kits.

3.1.8 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR kann durchgeführt werden zum Screening auf Bakterien, die das Plasmid mit gewünschtem Insert aufgenommen haben.

Dazu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

5 μ l 10* Puffer
10 μ l Lösung Q
1 μ l dNTPs
0,5 μ l Taq-Polymerase
31,5 μ l H₂O
+ 1 μ l RV3 Primer 25 μ M
+1 μ l R1 Primer 25 μ M

Anschließend beimpfen des Reaktionsansatzes mit den Bakterien.

Vordenaturierung	95°C 5min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95°C 40sec	
Annealing	60°C 44sec	
Elongation	72°C 2min	

Finale Elongation 72°C 10min
4°C hold

3.1.9 DNA-Konzentrationsbestimmung

Je nach Bedarf und vorliegender Konzentration wurde die DNA vor der Konzentrationsbestimmung 1:10 oder 1:100 verdünnt. Die Messung erfolgt mit dem Spektrophotometer (NanoDrop). Dabei wird die Absorption der Proben bei 260nm und 280nm gemessen, um Konzentration und Reinheitsgrad zu bestimmen. Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion (E) bezeichnet. Die Extinktion errechnet sich dabei aus dem Lambert-Beerschen Gesetz: $E = \epsilon cd$ (E= Extinktion; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [cm^2 pro mol]; c = Konzentration der absorbierenden Moleküle pro mol; d = Schichtdicke [cm]). Einer Extinktion von 1 entsprechen 50 $\mu\text{g/mL}$ doppelsträngiger DNA, reine DNA hat ein Verhältnis $A_{260/280}$ von 1.8. Als Referenz wird nukleasefreies Wasser eingesetzt.

3.1.10 Sequenzierung

Mit Hilfe des Kapillarsequenzierers 3130xl Genetic Analyzer der Firma ABI (Institut für Humangenetik, Uniklinikum Regensburg) werden die verschiedenen Konstrukte sequenziert.

Vorab muss das sogenannte Cycle Sequencing durchgeführt werden:

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

2 μL 5* Puffer

0,3 μL BD 1.1 (Enzym)

5,7 μL H₂O

+ 1 μL Primer 25 μM

+ 1 μL Template (30ng)

Primer: forward RV3, reverse GL2 (jeweils eigener Ansatz mit nur einem Primer)

Vordenaturierung	3min 96°C	
Denaturierung	30sec 96°C	} 25 Zyklen
Annealing	30sec 55°C	
Elongation	3min 60°C	
Finale Elongation	5min 60°C	
Pause	hold 4°C	

Als nächster Schritt erfolgt das Fällern der DNA:

Dazu wird nach dem Cycle Sequencing folgendermaßen vorgegangen:

+ 2µl NaAc (3M, pH=4,9)

+25µl 100% EtOH

Anschließend zum Fällern vortexen, und dann bei 4300U/min zentrifugieren bei 15°C 20min, Überstand abnehmen und Pellet trocknen.

+100µl 70% EtOH (um Salz herauszuwaschen)

Es wird wieder bei 4300U/min bei 15°C 20min zentrifugiert.

+10µl HIDI (Formamid)

Zum Lösen der DNA wird gevortext. Die gelöste DNA wird in eine 96-well-Platte pipettiert.

Anschließend wird die DNA nun sequenziert. Die Qualität der Sequenzierung wird mit Hilfe der entsprechenden Software (Sequence Scanner, siehe Tabelle 10) überprüft. Die Auswertung erfolgt mittels Sequence Alignment, dazu wird das Programm Clustal W benutzt. Mit diesem Programm können zwei DNA- Sequenzen miteinander verglichen werden, d.h. es wurde die gewünschte Sequenz mit der in der Sequenzierung erhaltenen Sequenz verglichen und die Übereinstimmung überprüft.

Nach der Sequenzierung wurde von den passenden Konstrukten eine DNA-Präparation (Midiprep bzw. EndoFree Midiprep, siehe 3.1.7) durchgeführt.

3.1.11 Konservierung in Glycerinkulturen

Die Bakterienklone, die das passende Plasmid mit Insert aufgenommen haben, werden nach der Sequenzierung konserviert, um bei Bedarf wieder neue DNA daraus gewinnen zu können. Dazu wurde in einem Röhrchen eine 2ml ÜN-Kultur mit den vorher ausgestrichenen Bakterien angeimpft. 500µl ÜN-Kultur werden in einem

Cryotube mit 500µl 30% Glycerin versetzt und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. Dieser Glycerinstock kann dann dauerhaft bei -80°C aufbewahrt werden. Bei Bedarf kann mit diesen Bakterien wieder Medium beimpft werden.

3.1.12 Mutagenese

Das QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene bietet eine schnelle Methode für die Mutagenese von doppelsträngiger Plasmid DNA. Zur Mutagenese sind spezielle Primer (siehe Tabelle 2: verwendete Primer) nötig, die online mit dem Quick Change Primer Design Programm, das von Stratagene zur Verfügung gestellt wird, entworfen werden können. Die Methode basiert darauf, dass der Primer, der die Mutation enthält, an den Template-Strang bindet. Der Primer wird per PfuTurbo DNA Polymerase verlängert ohne diesen zu ersetzen. Somit wird doppelsträngige DNA synthetisiert, wobei ein Strang die gewünschte Mutation enthält. In einem weiteren Schritt werden die entstandenen PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym Dpn I verdaut, welches exklusiv methylierte DNA schneidet. Da bei den synthetisierten DNA-Molekülen nur der Template-Strang methyliert ist, wird dieser verdaut. Die übrige, mutierte Einzelstrang-DNA wird daraufhin in kompetente Zellen transformiert und in vivo in doppelsträngige DNA überführt. Die daraus erzeugte mutierte Plasmid-DNA kann wie unter 3.1.7 beschrieben aus den Zellen isoliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Methode benutzt um konservierte PU.1-Bindestellen im Promotor des *Stap1*-Gens zu mutieren. Dabei werden die Primer so entworfen, dass das PU.1 Bindemotiv 5'-GGAA-3' bzw. 5'-TTCC-3' in 5'-CAAT-3' / 5'-CAAA-3' bzw. 5'-ATTG-3' / 5'-TTTG-3' mutiert wird. Es werden also zwei/drei Basen substituiert, um Transkriptionsfaktor-Bindung zu verhindern.

Die Mutagenese wird nach dem Protokoll des Mutagenese Kits durchgeführt.

3.2 Zellkultur

3.2.1 *Escherichia coli*

Ausgehend von Einzelkolonien oder Glycerinkulturen wird *Escherichia coli* (*E. coli*) bei 37°C in LB₀- Flüssigmedium bzw. auf LB₀-Agarplatten (Sambrook 1989) angezogen. Bei Anzucht im Flüssigmedium werden bei kleinen Volumina Falcon Tubes, bei größeren Volumina Erlenmeyerkolben verwendet. Die Flüssigkulturen werden bei ca. 300 rpm geschüttelt. Zur Selektion dienen LB_{amp}-Flüssigmedien bzw. Platten.

Für die Plasmidtransformation wird der *E. coli DH5 alpha*-Bakterienstamm verwendet. Benötigte Klone werden als Glycerinkultur aufbewahrt. Hierbei werden Einzelkolonien in 2 ml flüssigem Selektionsmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 angezogen. 500 µl dieser Kultur werden mit 500 µl sterilem 85% Glycerin in einem Kryocup gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Zelllinien RAW264.7 und BV2

Die Zellkultur der RAW264.7- und BV2-Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank mit Zellkultur-geeignetem Equipment. Die Zellen werden in T175-Zellkulturflaschen der Firma Nunc kultiviert.

Beide Zellen wachsen in unterschiedlichen Medien. Für die RAW264.7 Zellen wird das Medium DMEM High Glucose mit den Zusätzen 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin, für die BV2 Zellen das Medium RPMA mit den Zusätzen 5% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 1,95 µL β-Mercaptoethanol verwendet. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre.

Die beiden Zelllinien wachsen in den Zellflaschen als adhärente Monolayer.

In Kultur müssen die Zellen dann jeden dritten Tag bei vollständiger Konfluenz gesplittet werden, d.h. nachdem das alte Medium durch Neues ersetzt wurde, werden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt. Anschließend wird die Zellsuspension 3:1 verdünnt erneut in Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen können

mittels des inversen Mikroskops angeschaut und auf ihren Zustand und die Dichte hin beurteilt werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 10µl der Zellsuspension verwendet und mit 90µl Medium verdünnt. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:10. 10 µl dieser Verdünnung werden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Es werden die Zellzahlen von 16 Kleinquadraten summiert, daraus ergibt sich die Zellzahl eines Großquadrats. Der Mittelwert aus den vier Großquadraten wird dann in die folgende Formel zur Berechnung der Zellzahl eingesetzt:

Zellzahl/ml: MW * Verdünnungsfaktor (10) * Kammerkonstante (10^4)

3.2.2.1 Aussäen der Zellen

Zuerst wird das alte Medium abgesaugt und durch Neues ersetzt. Die Zellen werden wie oben beschrieben abgelöst und in Suspension gebracht.

Die Zellen werden in 12-Well Platten ausgesät. In die Wells wird jeweils 1ml des entsprechenden Mediums gegeben. Dazu werden dann 60µl (RAW) bzw. 200µl (BV2) der Zellsuspension gegeben. Anschließend werden die Zellen für 24h inkubiert.

3.3 Reporter-gen-Assay

Der Reporter-gen-Assay bietet die Möglichkeit, mit Hilfe verschiedener Plasmidkonstrukte die Aktivität von bestimmten Promotorabschnitten und die Funktion von Transkriptionsfaktorbindestellen innerhalb bestimmter Promotorregionen zu untersuchen.

3.3.1 Verwendete Konstrukte

Als Ausgangsvektor für alle Plasmidkonstrukte dient der Vektor pGL4.10[*luc2*] der Firma Promega. Um die regulatorische Aktivität von verschiedenen Promotorkonstrukten auf die Genexpression des jeweiligen Gens zu untersuchen, werden die Promotorkonstrukte in den pGL4.10[*luc2*] Vektor kloniert.

Als Reportergen dient das Enzym Firefly Luciferase aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*, da sich dieses Nachweisverfahren durch das Fehlen eines eukaryontischen Äquivalentes sowie durch seine sehr hohe Sensitivität auszeichnet (de Wet, Wood et al. 1987). Die Stärke der Expression des Reportergens sollte zu einer Aussage über die Aktivität verschiedener Promotorregionen in der jeweiligen Zelllinie führen.

3.3.2 Transiente Transfektion

Besonders für adhärente Zellen eignet sich die Transfektion mit speziellen Transfektionsreagenzien. Dies erfolgt meist mithilfe von Liposomen. Aufgrund der negativen Ladung seines Phosphatrückgrates wird das entsprechende genetische Material von den positiv geladenen Köpfen der Liposomen umschlossen und durch Kontakt mit der Zellmembran ins Innere der Zelle entlassen.

In dieser Arbeit werden die Zelllinien BV2 und RAW264.7 mit FugeneHD der Firma Roche bzw. mit Mirus TransIT-Lt1 Reagenz der Firma Stratagene transfiziert. Die Transfektionsart von FuGeneHD wird durch Roche nicht genauer beschrieben, jedoch handelt es sich hierbei um eine nicht-liposomale Transfektionsmethode. Der Hersteller gibt an, dass FugeneHD mit den zu transfizierenden Nukleinsäuren komplexiert und unter geringen morphologischen und physiologischen Veränderungen durch die Zellmembran transportiert wird. Der Vorteil der nicht liposomalen Transfektion liegt somit in der geringeren Toxizität gegenüber den Zellen. Auch die Transfektionsart durch das TransIT-Lt1 Reagent wird vom Hersteller Mirus nicht beschrieben. Es handelt sich um ein Breitspektrum-Transfektionsreagenz, das für verschiedene Zelltypen geeignet ist. Dabei kann man eine hohe Effizienz bei geringer Zelltoxizität erzielen.

3.3.2.1 Transiente Transfektion von RAW264.7 und BV2 Zellen mit FuGeneHD

Bei der transienten Transfektion wird Plasmid-DNA in Zellen eingebracht, welche in den Nukleus einwandert und bei Vorhandensein eines passenden Promotors transkribiert wird. Der Nachteil bei der transienten Transfektion besteht darin, dass

episomale DNA meist innerhalb von zwei bis vier Tagen degradiert. Diese Methode ist also eher für schnelle Analyse von Genen oder Proteinexpression in kleinem Maßstab geeignet.

Pro Well einer 12-Well Platte werden 24 h vor Transfektion 300.000 RAW- Zellen/ bzw. 250.000 BV2 Zellen ausgesät.

Die ausgesäten Zellen werden in 1ml des jeweiligen Mediums bei 37°C + 5% CO₂ in gesättigter Wasserdampfatmosphäre für 24 h inkubiert.

Transfektionsprotokoll:

3 µg DNA werden mit Nuklease-freiem Wasser auf 5 µL Volumen aufgefüllt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

6 µL FuGeneHD-Reagenz werden vorsichtig in 94 µL DMEM (Serum freies Medium) pipettiert ohne dabei den Rand des verwendeten Gefäßes zu berühren, um einen Transfektionskomplex von 100 µl zu bekommen. Die verdünnte DNA wird vorsichtig in den FuGeneHD-Medium Mix pipettiert, durch auf- und abpipettieren gut gemischt und anschließend 15 min bei RT inkubiert. Der Transfektionskomplex wird tropfenweise zu den Zellen gegeben, während die Zellen geschwenkt werden, um zu hohe lokale Konzentrationen zu vermeiden (im 12-Well Plate 50 µl Transfektionskomplex pro Well)

3.3.2.2 Transiente Transfektion von RAW264.7 und BV2 Zellen mit LT1 Transfektionsreagenz

Das Prinzip der transienten Transfektion mit LT1 Transfektionsreagenz ist in 3.3.2.1 beschrieben.

Für die zu verwendende DNA werden Stocklösungen mit der Konzentration 1µg/µl hergestellt. In jedes Cup werden 100µl Serum freies Medium pipettiert. In das Medium kommen 3µl LT1 Reagenz und schließlich 1µl der jeweiligen DNA Stocklösung. Somit wird 1µg DNA zur Transfektion verwendet. Dieser Transfektionskomplex wird durch auf- und abpipettieren gemischt. Nach 30 min Inkubation wird der Komplex auf die Zellen geträufelt. Die Plates werden dabei geschwenkt um eine gleichmäßige Konzentration des Transfektionskomplexes im Well zu erreichen.

3.3.3 Stabile Transfektion

Unter stabiler Transfektion von Zellen versteht man die permanente Integration von Plasmid-DNA in chromosomale DNA eines Säuger-Genoms, wobei die Stelle der Integration zufällig ist (Murnane, Yezzi et al. 1990). Diesbezüglich ist zu beachten, dass Insertion in inaktives Heterochromatin eine eher schlechte bis gar keine Transgenexpression zur Folge hat. Stabil transfizierte Zellen gewährleisten generell besser reproduzierbare und definierte Transgenexpression über einen längeren Zeitraum hinweg.

Die zu transfizierende Plasmid-DNA muss vor der Transfektion mit einem passenden Restriktionsenzym linearisiert werden und zusätzlich muss das Plasmid eine Antibiotika-Resistenz zur Selektion der Transgen beinhaltenden Zellen tragen. Sollte dies nicht der Fall sein, kann man einen Resistenz-exprimierenden Vektor im Verhältnis 1:6 kotransfizieren.

Zur stabilen Transfektion wird dasselbe Protokoll wie unter 3.3.2.1 verwendet, jedoch werden zuvor 15 µg der eingesetzten Plasmid-DNA in einem 60 µL-Restriktionsenzymverdau (3.1.4) linearisiert und anschließend mit dem QIAEXII-Kit (3.1.3) aufgereinigt. Nach photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration werden 3 µg DNA transfiziert.

24 Stunden post-Transfektion werden die Zellen unter Selektivbedingungen kultiviert. Diejenigen Zellen, die keine Resistenz ausbilden, also das Plasmid nicht stabil integriert haben, sterben ab. Nach etwa 14 Tagen haben sich Zell-Klone der resistenztragenden Zellen gebildet, welche mit einer 10 µL-Pipette aufgenommen und in ein 12-Well Plate überführt werden können. Wenn die benötigte Zellzahl erreicht ist, wird die Genexpression des jeweiligen Gens per Luciferase Assay überprüft und unter Selektivbedingungen weiterkultiviert.

3.3.4 Stimulation der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid ist ein bakterielles Endotoxin, das in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien enthalten ist. Beim Zerfall von Bakterien wird LPS frei und wirkt dabei toxisch. LPS wird durch Komponenten des angeborenen Immunsystems detektiert und dabei die inflammatorische Zellantwort in Gang gesetzt. Durch LPS-

Stimulation können in vitro Inflammationsbedingungen simuliert und untersucht werden.

Für die durchgeführten Stimulationsversuche wurde eine LPS-Konzentration von 100ng/ ml eingesetzt. Die Stimulation erfolgte 24h nach der Transfektion der Zellen.

3.3.5 Lyse der transfizierten Zellen

48h nach der Transfektion werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden pro Well 250 µL Luciferase Lysis Puffer zugegeben und 15min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Danach werden die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 ml Cup überführt und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. 200 µl des Überstands, der die Luciferase enthält, werden in ein frisches Cup pipettiert.

3.3.6 Luciferase Assay

Die Lumineszenzmessung erfolgt mit Hilfe des Platereaders FLUOstar Optima von BMG Labtech mit angeschlossener Software. Zur Bestimmung der Luciferase Aktivität werden pro Well 20 µl des Zellextraktes (siehe 3.3.5) pipettiert und in der Messkammer des Platereaders platziert. Die Chemilumineszenz wird durch automatische Injektion von 100 µL Luciferin-Reaktionsgemisch des Luciferase Assay System (Promega) pro Probe für 10 sec gemessen und der Messwert in RLU/s (Relative Light Units pro Sekunde) ausgegeben.

Für jede Probe findet eine Duplikatmessung statt und zusätzlich werden folgende Kontrollen mitgeführt:

- Positivkontrolle: pGL3 basic CMV > Reporter gen unter Kontrolle des CMV-Promotors
- Negativkontrolle: pGL4.10 Basic > Reporter gen ohne Promotor

Die Kontrollen sollen sicherstellen, dass die resultierende Enzymaktivität Ergebnis der Transfektion ist und sich nicht auf eine endogene Enzymaktivität zurückführen lässt, bzw. nicht auf einer Induktion durch das Transfektionsreagenz basiert.

4. Ergebnisse

Zur Aufklärung der Funktion von Mikroglia in der molekularen Pathologie der Retinoschisis wurde am Institut für Humangenetik eine genomweite Expressionsanalyse in primären Mikroglia von *Rs1h^{-/-}* versus *wt* (P14) Mäusen durchgeführt. Die Expressionsanalyse erfolgte mit der Affymetrix 430 2.0 Mouse Genome Array-Plattform.

Dabei wurden 94 unbekannte und 140 bekannte Gene gefunden die signifikant reguliert waren. Mit Hilfe einer Datenbankrecherche, wobei nach einem Zusammenhang der gefundenen Gene mit den Schlagworten „immune + macrophage + hematopoietic“ gesucht wurde, konnte die Zahl auf 17 Gene reduziert werden. Durch anschließende Validierung mit Quantitative Real-Time PCR wurden 8 Gene zur näheren Analyse ausgewählt.

Gene	Microglia		Retina		BMM	P14	Peritoneal-M.		RAW	RAW	RAW
	P14	RS1	P18	RS1	RS1		LPS	INF γ	LPS	INF γ	CSPG-DS
	vs. WT		vs. WT								
							LPS	INF γ	LPS	INF γ	CSPG-DS
Al58015 (Stap-1)	↑↑		↑		↑	-	↑	-	↑	-	-
Mm.24097	↑↑		↑↑↑		↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Al60783	↑↑		↑↑		-	-	↑↑↑	-	n.e.	n.e.	n.e.
Al429294	↑		↓		↓	↓	-	-	↑↑		↓↓
4930583H14Rik	↑		-								
A830007P12Rik	↑		↓								
BC00677	↓↓		↓								
22104909E12Rik	↓↓↓		-								

Tabelle 11: Darstellung der Genexpression

Die Tabelle stammt aus einer vorhergehenden Arbeit meiner Arbeitsgruppe. Sie zeigt wie sich die mRNA Level auf Stimulation hin in den verschiedenen Geweben verhalten. (n.e. nicht erfasst)

Literaturrecherche zeigte, dass das Gen Al58015 ein Synonym für Stap-1 ist.

In aktivierter retinaler Mikroglia (von RS1 Knock-Out Mäusen) ist die Expression von Stap-1 wie in Tabelle 11 gezeigt sehr hoch und Stap-1 könnte an der Aktivierung der

Mikroglia beteiligt sein. In dieser Arbeit wurde deshalb die Regulation der Genexpression untersucht.

Ein weiterer Datensatz meiner Arbeitsgruppe lieferte Daten zur PU.1 abhängigen Regulation der Genexpression. In einer genomweiten Analyse von PU.1 Zielgenen mit der ChIP on Chip Methode konnten zwei Bindestellen innerhalb des Stap-1 Promotors identifiziert werden. Diese Analyse zeigte, dass Stap-1 in vivo an den Stap-1 Promotor bindet (Weigelt, Moehle et al. 2008). Diese Ergebnisse waren die Grundlage für die Untersuchung der PU.1 abhängigen Promotoraktivität von Stap-1.

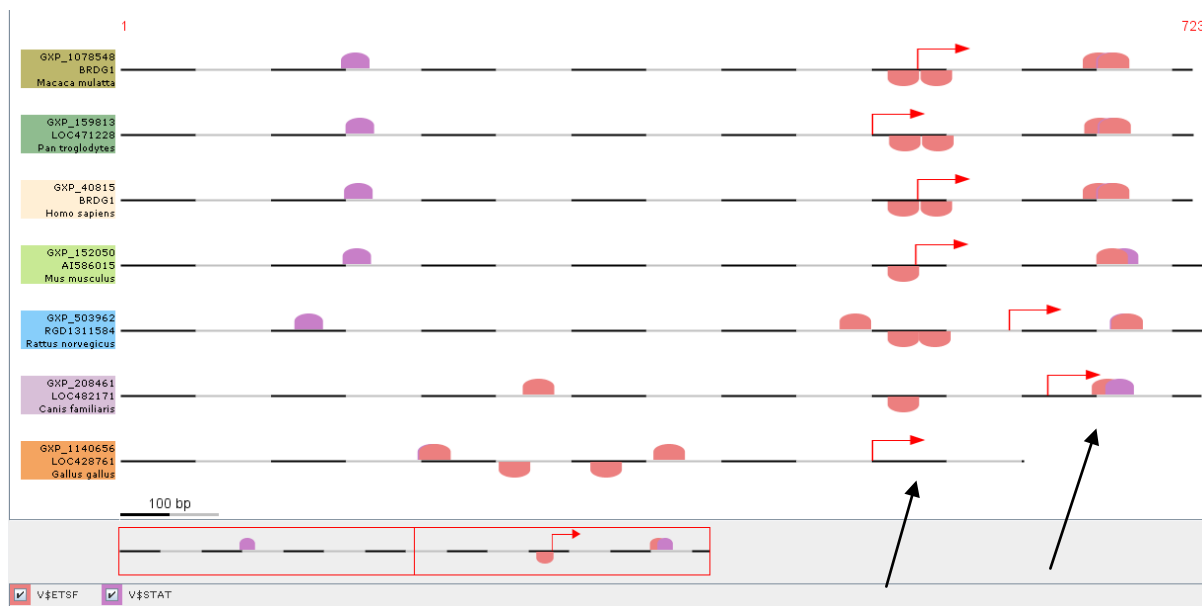


Abb. 2: konservierte PU.1 Bindestellen

Die Abbildung zeigt die PU.1 Bindestellen in verschiedenen Spezies. Mit Pfeilen markiert sind zwei Bindestellen hervorgehoben, die über verschiedene Spezies konserviert sind.

Für die Untersuchung des Stap-1 Promotors wurden in einem ersten Ansatz 6 Promotorkonstrukte verwendet. 3 Konstrukte unterschieden sich in ihrer Länge, 3 weitere Promotorkonstrukte enthielten mutierte PU.1 Bindestellen. Diese Konstrukte sollten über die PU.1 Regulation der Genexpression Aufschluss geben.

Zur Bestimmung der Promotor-Aktivität wurde ein Luciferase Assay durchgeführt. Dazu wurden jeweils Duplikate der Promotorkonstrukte sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle gemessen. Als Negativkontrolle diente der pGL4.10 Leervektor und

als Positivkontrolle wurde der pGL3-basic-CMV Vektor verwendet. Die Luciferasemessung wurde wie in 3.3.6 in beschrieben durchgeführt.

4.1 Klonierung der Stap-1 Promotorkonstrukte

Der Stap-1 Promotor liegt im Bereich -1300bp bis 120bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Innerhalb dieses Bereichs wurden drei Promotorkonstrukte verschiedener Länge hergestellt. Die Herstellung dieser Konstrukte erfolgte mit der Polymerasekettenreaktion (siehe 3.1.1).

```

LOCUS      GXP_152050      1393 bp      DNA
DEFINITION loc=GXL_126900|sym=AI586015|geneid=56792|acc=GXP_152050|
            taxid=10090|spec=Mus musculus|chr=5|ctg=NC_000071|str=(+)|
            start=87145107|end=87146499|len=1393|
            tss=1201,1205,1238,1283,1293|
            descr=expressed sequence AI586015|
            comm=GXT_12949003/AK041474/612/gold;
            GXT_12959307/AK042475/567/gold;
            GXT_13071569/NM_019992/612/bronze;
            GXT_21811101/AK162655/530/gold;
            GXT_21819197/AK153661/534/gold;
            GXT_22185370/XM_001003191/622/bronze;
            GXT_22185375/XM_001003196/622/bronze;
            GXT_22185383/XM_001003185/622/bronze
ACCESSION  GXP_152050
BASE COUNT 453 a 256 c 276 g 408 t
ORIGIN
1  GGGGAAGGGG CTTGGTTTCT TGCCAGTGCA ATAAATAGTG TTCAATAAAA AATGAAAGGA
61  AGAACCGCAG AATCTGTGAG GATCGATCAG ACTGACCAAG AATGAAATTT TGAAATCTAT
121 AAGGTTTGGG GGAGGTGACT GAAGAAGAAA TATTTGATTG TTGGTACATT GAGGATTAAT
181 GGTATTTTACA AATCAACAGT CCAAAAGAGT CTACCTGGTT TGATGAACCTA GATTAATTTT
241 AATTAATTTA TTTATTTGTG CATTACTTTA TTTATTTATT GCTTACTTTT TAAAATGGTA
301 AAAAGACAAA ATTAAGCAGA TGTTTAATTA ACATAAATAT TTCTCTCTGG GCTCAGGACA
361 CTAAGGGACA TACTACCAA TTCGTTGCTT GAGCCCCCAC ATATTAGAAG AGAACCGATT
421 GCTACAAATT GTCCTCTAAG TTCCACATGT GCACTGTAAC ATGTGCACAC TTGAACCTAC
481 CTGAATATTA GCACACACAA ACACACACAC ACACATGCAC AGCCCTACAC ACACACACAC
541 ACAAGTAAA TGTCAAAACA TCAAAAATAT TCTTTTCTGT ATTTTCTGT AAGTCATCTT
601 TCTCTCTTAA AGCTCTCTGG CAACAGCTAG GTATGATGAC ATAAATCTTT AAGCCCAACA
661 CTTTGGAGGC AGAAGCAAGT AGACCTCTGT GAGTCTGAGA CCAGCCTGGT CTACACAGTA
721 GAATTTTCAGG CTATCCACGG CTACAAAAAT GAGACCATAT TTCAATAAAA AAAAAAAAAA
781 AAACACTATT GGATATATAG CCAATAGGAT CAATACAAAA ATATTC AATG AAGGAATTTT STAT
841 TTAATGGATA CAGTTTATTT AAGTCACATA TCTTCGAAAT AAAGGCAGAG AACAAATCAAC
901 AAAAATGAAA GCTGGAAAAG CTAAGTGTGT CGTTGGTGTT GCTCCAAAAG TCTCGCACCT
961 GCTCCTTTCA TCATTAGGAG ATGGTAATCT GCTGTTTATT TTGTTACCAT CAACCTAAGC
1021 ACATGAAGTT TACACAGCAG ACGCCTTTTA AAAGTTGGTC TGTGCCTGAT CTTTTTTACT
1081 TCACAATAAC TGAAGGAGGG AAA GTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
1141 TGTGTGTGTG CTGTTGGTGG AAGGGTTGGT GGTAAAAAG CGAGTTGAGA CTTC TCTTT PU.1
1201 GAACAGTTGC CTCTCCTCTC AACACTACGG AGATTTCGGT TTTTGTGAGG CTGGATAGAA IRE
1261 CTGAAAGCAA GCCAACTCC AAAGCAAAGG CTATGATGGC GAAAAAGCCC CCGAAACCTG
1321 CCCCTCGCAG GATCTTCCAG GAAAGACTGA AGATCACTGC TCTGCCCTG TACTTTGAAG
STAT/PU.1
1381 GATTTTTTACT GGTCAAACGG TCTGATCACC AG

```

repeats
 TF sites
 TSS, ATG, Ex/In
 forward primers
 reverse primers

forward: XhoI site

Stap1 Prom F1	CCCCTCGAG ATGAAAGGAAGAACCGCAGA	-1149
Stap1 Prom F2	CCCCTCGAG GCTTGAGCCCCACATATTA	-814
Stap1 Prom F3	CCCCTCGAG TAGCCAATAGGATCAATACAAAAA	-403
Stap1 Prom F4	CCCCTCGAG TGAAGGGTTGGTGGTTAAA	-43

reverse: HindIII site

Stap1 Prom R1	CCCAAGCTT TCAAAGTACAGGGGCAGAGC	+187
Stap1 Prom R2	CCCAAGCTT CCGTTTGACCAGTAAAAATCCT	+199

Abb. 3: Sequenz des Stap-1 Promotors

In dieser Abbildung ist die Sequenz des Stap-1 Promotors dargestellt. Die verwendeten Primer, Transkriptionsfaktorbindestellen, Repeats sowie der Transkriptionsstartpunkt sind jeweils farbig hervorgehoben.

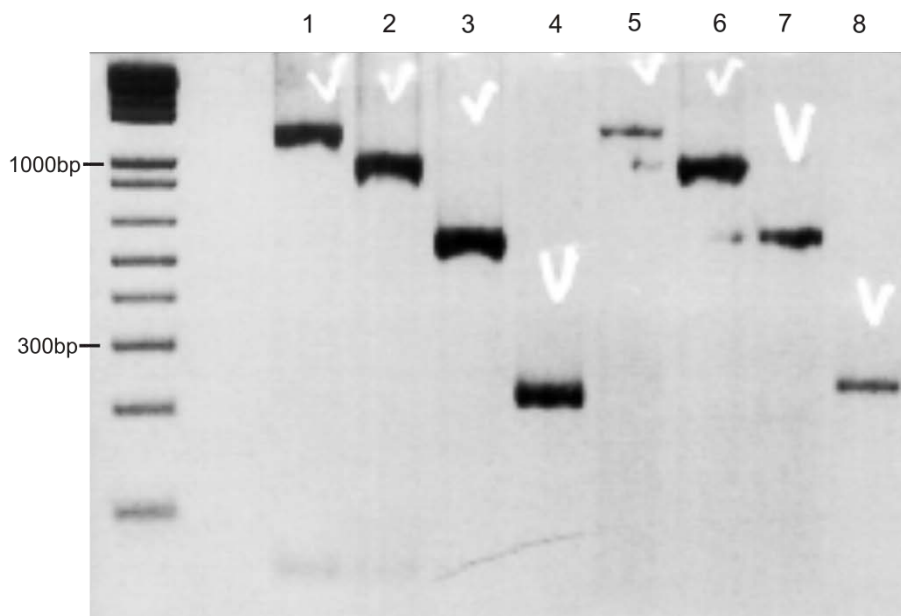


Abb. 4: Agarosegel der PCR-Produkte

Nach der PCR wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Links im Bild ist der Standard zu sehen, Konstrukte 1-4 sind mit dem Reverse Primer 1 (Stap1 Prom R1) entstanden, Konstrukte 5-8 mit dem Reverse Primer 2 (Stap1 Prom R2)

Längen der vier Konstrukte:.....1: 1336bp, 2: 1001bp, 3: 590bp, 4:230bp

Länge des pGL4.10 Vektors:4242bp

In Abb. 4 ist das Agarosegel der 8 PCR-Produkte, die wie in 3.1.1 beschrieben hergestellt wurden, gezeigt. Für die Arbeit wurden die Konstrukte, hier mit 1 bis 4 bezeichnet, verwendet, die mit dem Primer R1 entstanden sind, da hier die PCR-Ausbeute höher war.

Nach Aufreinigung (siehe 3.1.3) und Restriktionsverdau (siehe 3.1.4) konnten die Konstrukte in den Vektor kloniert werden.

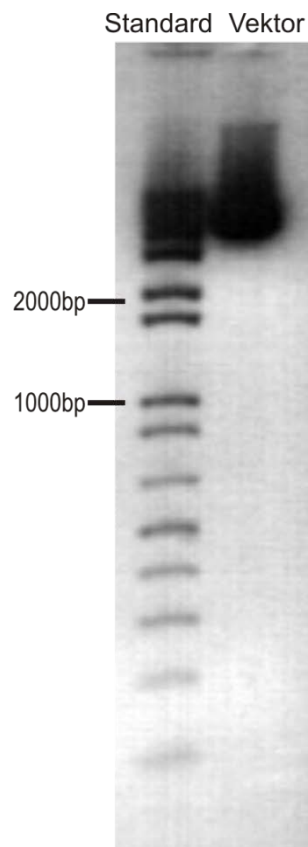


Abb. 5: Agarosegel des geschnittenen Vektors pGL4.10

Links im Bild ist der Standard aufgetragen, rechts der durch Restriktionsverdau geschnittene Vektor pGL4.10. Es ist eine dicke Bande zu erkennen. Wird der Vektor nicht geschnitten kann man drei Banden sehen, die durch verschiedene Formen des Plasmids zustande kommen (supercoiled, covalently bonded, circular single stranded).

In Abb. 5 ist das Agarosegel des geschnittenen Vektors pGL4.10 zu sehen. In diesen Vektor konnten nun die ebenfalls geschnittenen PCR-Produkte ligiert werden.

Nach Hitzeschocktransformation der Ligationsprodukte folgte eine DNA Minipräparation, mit der ein Kontrollverdau durchgeführt werden konnte.

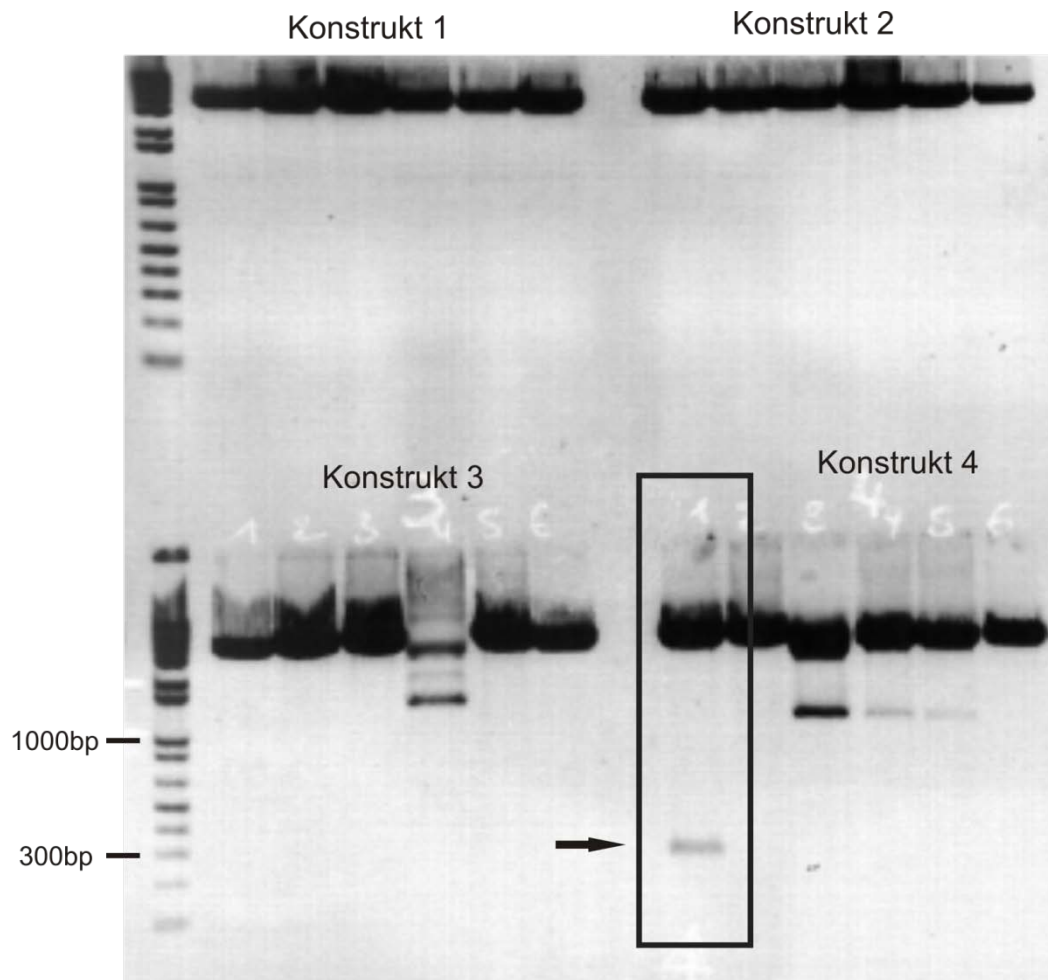


Abb. 6: Agarosegel des Kontrollverdaus mit Konstrukt 4

Ein Klon des Konstrukts 4 enthält das gewünschte Plasmid mit Insert (schwarz umrahmt).

Die Auftrennung in einem Agarosegel ergab bei einem Klon des Konstrukts 4 jeweils zwei Banden. Die beiden Banden entsprachen den Fragmentlängen von 230bp für das Insert und 4,2kb für den Vektor, die aufgrund der bekannten Schnittstellen berechnet werden konnten.

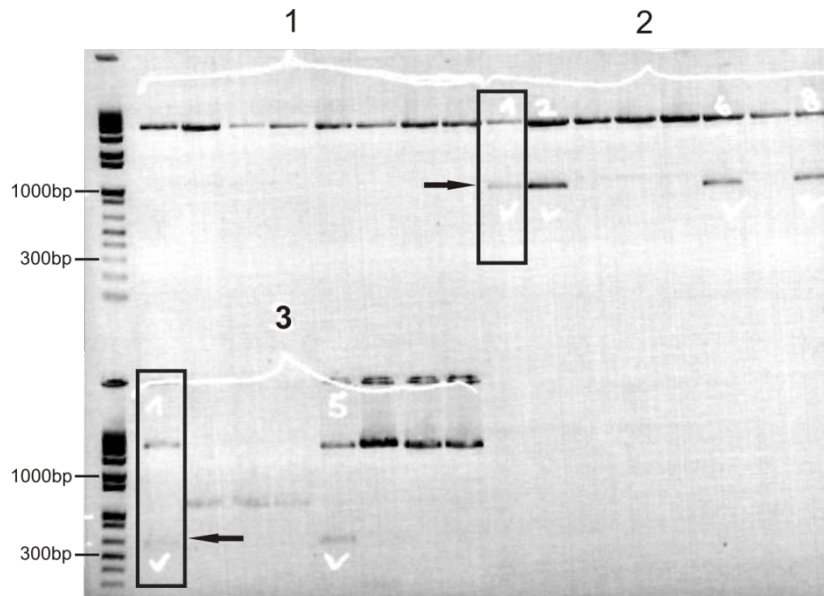


Abb. 7: Agarosegel des Kontrollverdaus mit den Konstrukten 2 und 3

Auf diesem Gel sind mehrere passende Klone zu sehen. Die später verwendeten Klone sind schwarz umrahmt dargestellt.

Die Auftrennung in einem Agarosegel ergab hier bei vier Klonen des Konstrukts 2 und bei fünf Klonen des Konstrukts 3 jeweils zwei Banden, die den Fragmentlängen von 1001 bp (2) bzw. 590 bp (3) für das Insert und 4,2 kb für den Vektor entsprachen. Es konnte kein passender Klon des Konstrukts 1 hergestellt werden.

Zum Nachweis der korrekten Insertsequenz wurde eine Sequenzierung (siehe 3.1.10) der Klone mit positivem Kontrollverdau durchgeführt.

Von dem Konstrukt mit richtiger Sequenz (Klon 1 des Konstrukts 2, Klon1 des Konstrukts 3 und Klon 1 des Konstrukts 4) wurde durch Kultivierung in LB amp Flüssigmedium Plasmid-DNA durch Endonuklease freie Midipräparation (siehe 3.1.7) gewonnen.

4.2 Mutation der Bindestellen des Transkriptionsfaktors PU.1

Der Promotor des *Stap-1* Gens enthält verschiedene Bindestellen an die Transkriptionsfaktoren binden. Darunter befinden sich zwei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor PU.1.

In einer vorhergehenden Arbeit meiner Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass PU.1 tatsächlich an diese zwei Bindestellen bindet. Durch Mutation dieser Stellen sollte nun untersucht werden welchen Einfluss die Regulation über PU.1 auf die Aktivität des *Stap-1* Promotors hat.

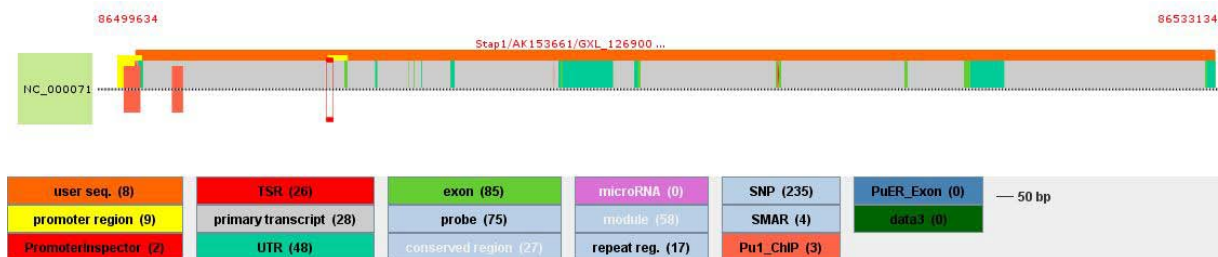


Abb. 8: Darstellung der PU.1 Bindestellen im *Stap-1* Promotor

Für die hier orange dargestellten Bindestellen konnte mit der ChIP on Chip Methode bereits gezeigt werden, dass PU.1 hier tatsächlich bindet.

Die Mutagenese erfolgte wie in 3.1.12 beschrieben. Durch die Mutation in den Bindestellen kann die Bindung des Transkriptionsfaktors PU.1 an den Promotor verhindert werden.

4.3 Transfektion

Die Transfektion erfolgt wie oben (3.3.2.1) beschrieben mit dem Fugene HD Transfektionsreagenz, 24h nach dem Aussäen der Zellen.

4.4 LPS-Stimulation

Zum Nachweis, ob die Promotoraktivität durch Stimulation der Zellen mit LPS gesteigert werden kann, werden jeweils 2 Duplikate mit 100ng LPS pro ml stimuliert. Dazu werden die Wells 24 Stunden nach der Transfektion mit dem LPS beträufelt.

4.5 Luciferasemessung der 6 Promotorkonstrukte

24h nach der LPS-Stimulation, also 48h nach Transfektion erfolgt die Luciferasemessung. Die Zellen müssen geerntet und anschließend lysiert (siehe 3.3.5) werden, damit schließlich die Luciferase gemessen werden kann.

4.5.1 Luciferasemessung in RAW264.7 Zellen

Zuerst erfolgte eine Messung in RAW264.7 Zellen. Die Messung wird wie unter 3.3.6 beschrieben durchgeführt. Nachfolgendes Diagramm zeigt das Ergebnis der Luciferasemessung.



Die Abbildung zeigt das Ergebnis der beschriebenen Luciferasemessung. Links im Bild sind die Promotorkonstrukte schematisch dargestellt. Rechts die Luciferasewerte, dargestellt in RLU, relative light units. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung an. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen in denen jeweils Duplikate gemessen wurden. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pGL4.10, als Positivkontrolle der CMV-Promotor.

In der Abbildung sind die Mittelwerte der beiden erhaltenen Messwerte aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messwerte.

Keines der hier gezeigten Konstrukte zeigt eine Aktivität. Die gemessenen RLU (relative light units) bleiben bei allen Konstrukten kleiner als 4000 und somit im Bereich der Negativkontrolle.

4.5.2 Luciferasemessung in BV2 Zellen

Anschließend an diese Messung in RAW264.7 Zellen wurde der gleiche Assay in BV2 Zellen durchgeführt.

Transfektion, LPS-Stimulation, Lyse und Luciferasemessung erfolgte analog dem Assay in RAW264.7 (siehe 4.3, 4.4 sowie 4.5).

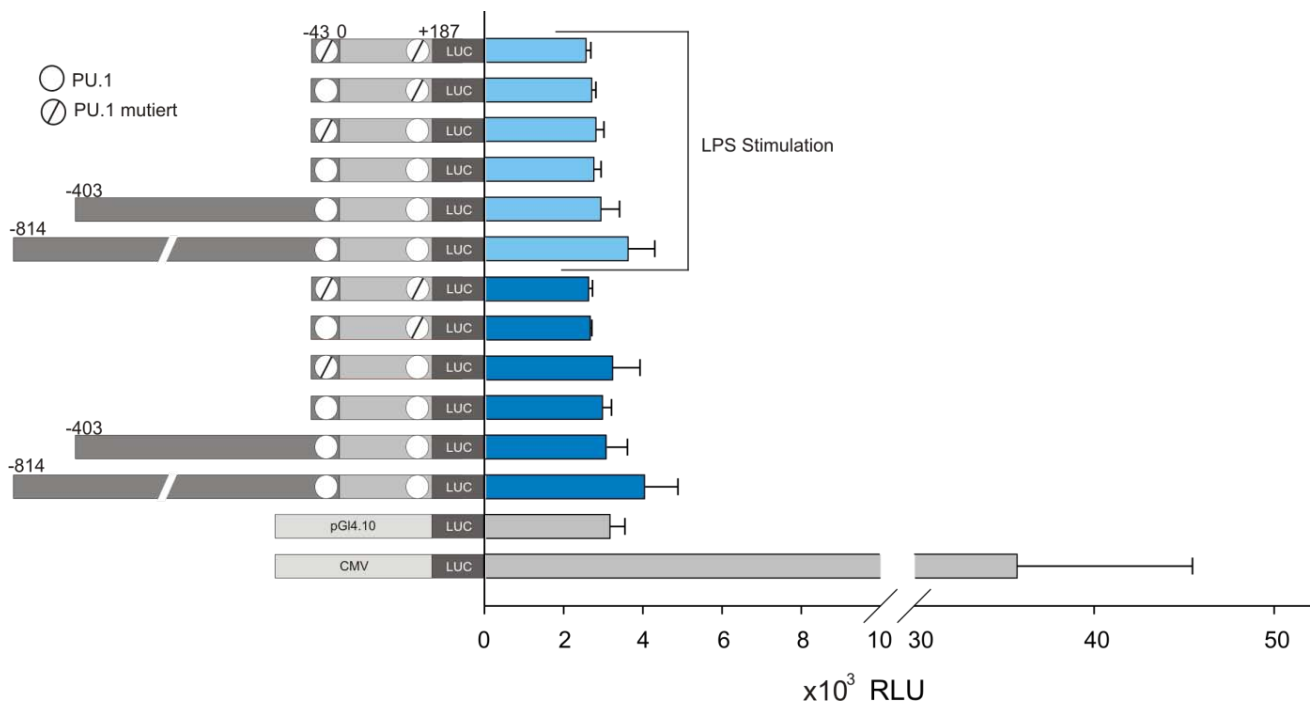


Abb. 10: Diagramm der Luciferasemessung der 6 Promotorkonstrukte in BV2 Zellen

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der beschriebenen Luciferasemessung. Links im Bild sind die Promotorkonstrukte schematisch dargestellt, rechts die Luciferasewerte, dargestellt in RLU, relative light units. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung an. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen in denen jeweils Duplikate gemessen wurden. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pGL4.10, als Positivkontrolle der CMV-Promotor.

Es wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt. Die in dem Diagramm aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus den insgesamt jeweils vier erhaltenen Werten.

Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messwerte. Das Ergebnis der Messung in den BV2 Zellen entspricht der vorhergehenden Messung in RAW264.7. Keines der gemessenen Konstrukte zeigte eine Aktivität. Auch in den BV2 Zellen übersteigen die gemessenen RLU (relative light units) nicht 5000 und sind somit kaum höher als die Negativkontrolle.

4.6 Stabile Transfektion

Aufgrund des unerwarteten Ergebnisses nach transienter Transfektion wurde ein Luciferase Assay in BV2 Zellen nach stabiler Transfektion (siehe 3.3.3) durchgeführt.

4.6.1 Ergebnisse der Luciferasemessung nach stabiler Transfektion

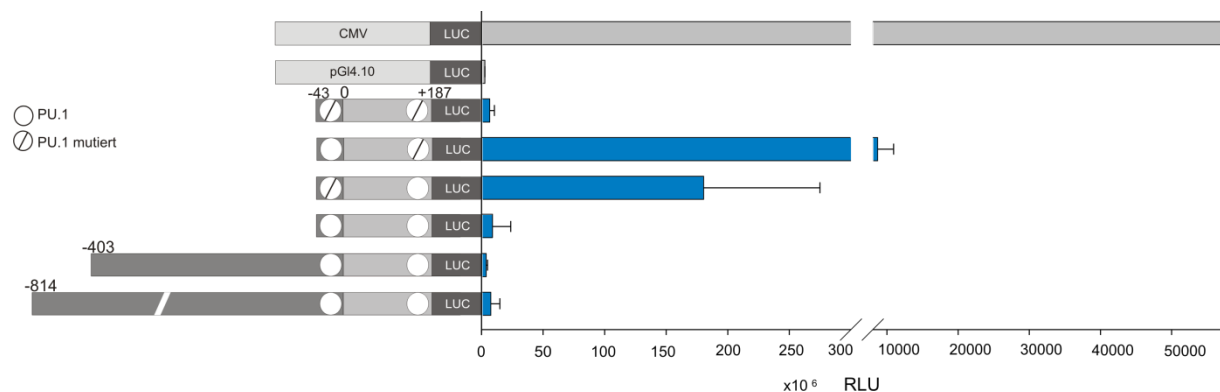


Abb. 11: Diagramm der Luciferasemessung nach stabiler Transfektion in BV2

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der beschriebenen Luciferasemessung. Links im Bild sind die Promotorkonstrukte schematisch dargestellt. Rechts die Luciferasewerte, dargestellt in RLU, relative light units. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung an. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils Duplikaten und mehreren Klonen, die das gleiche Promotorkonstrukt enthalten. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pGL4.10, als Positivkontrolle der CMV-Promotor.

Für jedes Konstrukt wurden mehrere Klone hergestellt, die alle einzeln gemessen wurden. Die Anzahl der Klone variiert zwischen 9 und 13. Die aufgetragenen Werte

entsprechen den Mittelwerten der Duplikate und Klone. Es wurden also insgesamt 18 bis 26 Werte gemittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Nach stabiler Transfektion zeigen die Konstrukte mit Mutation der PU.1 Bindestellen eine hohe Aktivität. Die Konstrukte ohne Mutation zeigen entsprechend den Ergebnissen nach transienter Transfektion keine Aktivität.

4.7 Klonierung neuer Promotorkonstrukte

Als nächster Schritt wurden neue Promotorkonstrukte hergestellt, die nicht mehr über den Translationsstartpunkt ATG hinausgehen. Möglicherweise konkurriert das Ribosom um den Translationsstartpunkt des Promotorkonstrukts und der Luciferase, weswegen kein funktionsfähiges Protein entstanden ist und deshalb geringe Luciferasewerte erzielt wurden. Zur Klonierung der neuen Promotorkonstrukte wurden die selben forward Primer wie vorher benutzt (siehe Tabelle 2). Mit dem nun verwendeten neuen reverse Primer enden alle neu klonierten Promotorkonstrukte an Position -12.

4.7.1 Ergebnisse der Luciferasemessung mit den neuen Promotorkonstrukten

Der oben beschriebene Luciferase Assay wurde nun mit den insgesamt 9 Promotorkonstrukten durchgeführt.

Transfektion, LPS-Stimulation, Lyse der Zellen und Luciferasemessung erfolgten genau wie in den Assays vorher (siehe 4.3, 4.4 sowie 4.5).

4.7.1.1 Luciferasemessung in RAW264.7 Zellen

Es erfolgte zuerst wie mit den sechs Promotorkonstrukten vorher wieder eine Messung in RAW264.7 Zellen.

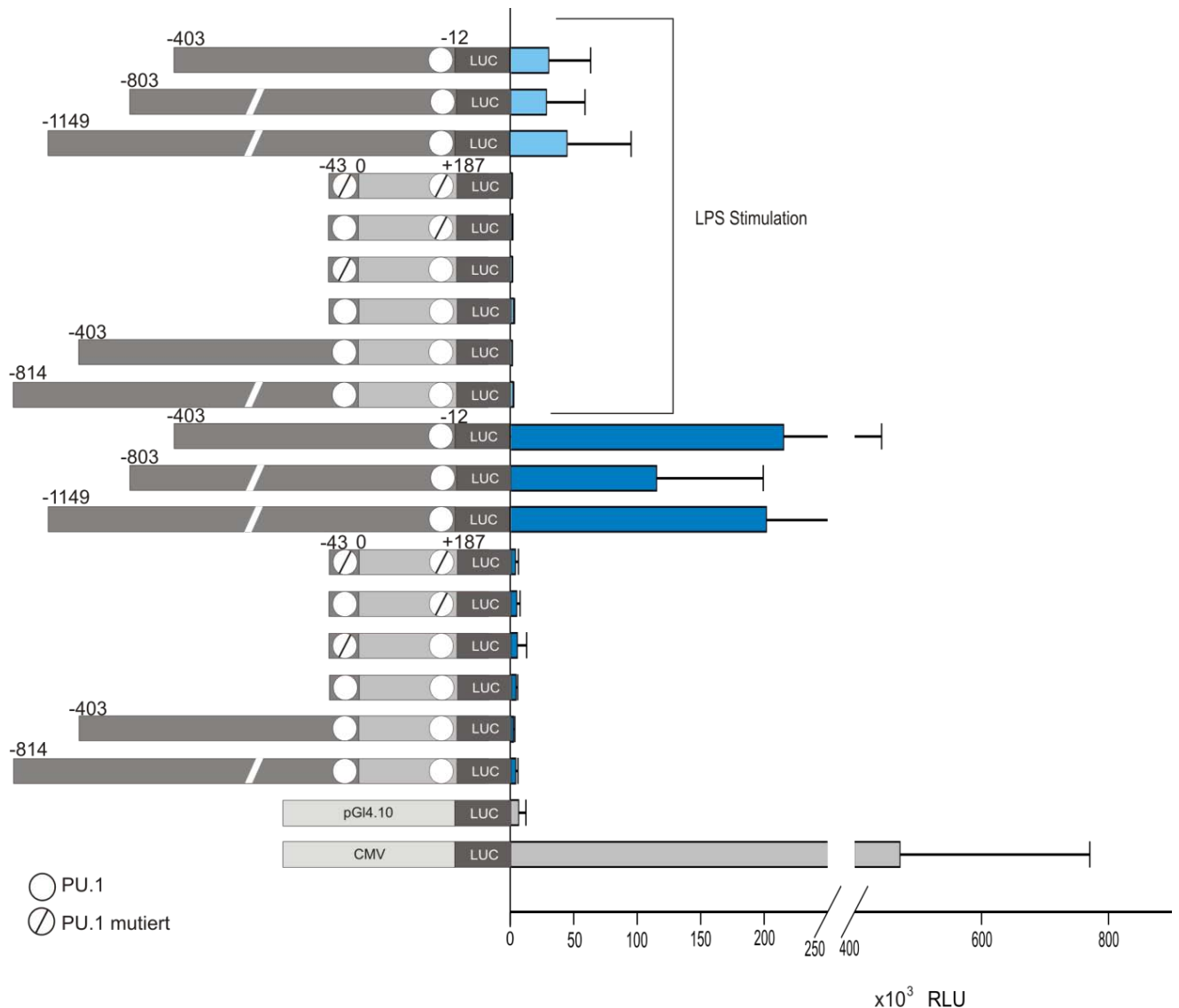


Abb. 12: Diagramm der Luciferasemessung in RAW

In der Abbildung ist das Ergebnis der Luciferasemessung der nun insgesamt neun verschiedenen Promotorkonstrukte dargestellt. Die neu klonierten Promotorkonstrukte sind in der Darstellung daran zu erkennen, dass der hellgraue Teil, der für die Sequenz des ersten Introns steht, fehlt. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils Duplikaten dreier unabhängiger Messungen. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pGL4.10 und als Positivkontrolle der CMV-Promotor.

Insgesamt wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Die aufgetragenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus den sechs erhaltenen Messwerten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messwerte.

Wie bei der Messung nach transienter Transfektion zeigen auch hier die sechs Konstrukte, die erst an der Stelle +187 enden, keine Aktivität. Die neu erstellten Konstrukte die nicht mehr über den Translationsstartpunkt hinausgehen (erkennbar am Fehlen des hellgrauen Anteils im Schemabild) sind aktiv. Sowohl vor als auch nach Stimulation mit LPS ist eine Promotoraktivität nachweisbar. Die Aktivität nach LPS Stimulation (bis 50 000 RLU) ist geringer als ohne Stimulation (bis 220 000 RLU).

4.7.1.2 *Luciferasemessung in BV2 Zellen*

Anschließend wurde die Luciferasemessung aller oben beschriebenen Konstrukte in BV2 Zellen durchgeführt.



Entsprechend der Messung in RAW264.7 wurde die Luciferase mit den insgesamt neun Promotorkonstrukten auch in BV2 Zellen gemessen. Das Ergebnis ist in diesem Diagramm dargestellt. Die neu klonierten Promotorkonstrukte sind in der Darstellung daran zu erkennen, dass der hellgraue Teil, der für die Sequenz des ersten Introns steht, fehlt. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils Duplikaten. Als Negativkontrolle diente der Leervektor pGL4.10 und als Positivkontrolle der CMV-Promotor.

Das hier dargestellte Ergebnis in BV2 Zellen entspricht dem oben dargestellten Ergebnis der Luciferasemessung in RAW264.7. Auch hier ist für die sechs an Position +187 endenden Konstrukte keine Aktivität nachweisbar. Anders ist dies bei den an Position -12 endenden Promotorkonstrukten, diese drei Konstrukte zeigen bis zu 800 000 RLU (relative light units). Auch in BV2 Zellen ist sowohl ohne als auch

mit LPS Stimulation Aktivität nachweisbar. Die stimulierten Zellen zeigen auch hier eine geringere Aktivität.

4.8 PU.1 Bindestellen-Mutation im Konstrukt -403/12

Wie weiter oben bereits beschrieben, enthält der Promotor des Stap-1 Gens verschiedene Stellen an die Transkriptionsfaktoren binden und somit die Genexpression steuern können.

```

TAG CCAATAGGAT CAATACAAAA ATATTCAATG AAGAATTTTT
TTAATGGATA CAGTTTATTT AAGTCACATA TCTTCGAAAT AAAGGCAGAG AACAAATCAAC
AAAAATGAAA GCTGGAAAAG CTAAGTGTGT CGTTGGTGTT GCTCCAAAAG TCTCGCACCT
GCTCCTTTCA TCATTAGGAG ATGGTAATCT GCTGTTTATT TTGTTACCAT CAACCTAAGC
ACATGAAGTT TACACAGCAG ACGCCTTTTA AAAGTTGGTC TGTGCCTGAT CTTTTTTACT
TCACAATAAC TGAAGGAGGG AAA GTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
TGTGTGTGTG CTGTTGGTGG AAGGGTTGGT GGTAAAAAAG CGAGTTGAGA CTTCTCTTT
GAACAGTTGC CTCTCCTCTC AACACTACGG AGATTTCGGT TTTTTTGAGG CTGGATAGAA
CTGAAAGCAA GCCAAACTCC

```

Abb. 14: Sequenz des kleinsten Promotorkonstrukts (-403/-12)

Hier ist die Sequenz des kleinsten Promotorkonstrukts (-403/-12) dargestellt. Im Stap-1 Promotor befinden sich zwei konservierte Pu.1 Bindestellen. Eine Bindestelle, hier in rot dargestellt, wurde mutiert. Die zweite Bindestelle liegt bereits hinter dem Translationsstartpunkt und ist in den neuen an Position -12 endenden Konstrukten nicht mehr enthalten.

Nach der Mutagenese (siehe 3.1.12) wurde eine Sequenzierung durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Mutation nun vorhanden ist.

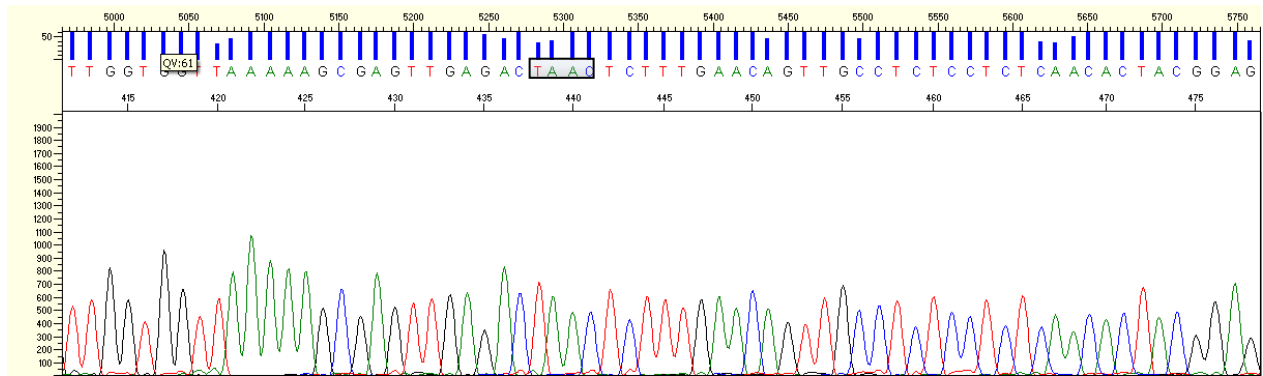


Abb. 15: Sequenzierung der Mutation

Nach der Mutation wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenz wurde mit dem Sequence Scanner ausgewertet. Ein kleiner Teil der Sequenz ist in dieser Abbildung zu sehen. Schwarz umrahmt sind die vier Basen der PU.1 Bindestelle dargestellt. Statt TTCC lautet die Sequenz nun TAAC.

Die ursprüngliche Sequenz der PU.1 Bindestelle TTCC wurde in TAAC mutiert, so dass nun keine Bindung des Transkriptionsfaktors mehr stattfinden kann.

4.8.1 Luciferasemessung des mutierten Konstrukts

Anschließend an die Mutation wurde auch mit diesem Promotorkonstrukt ein Luciferase Assay durchgeführt. Es wurden jeweils die an Position -12 endenden Konstrukte (waren in den vorherigen Messungen aktiv) und das mutierte Konstrukt gemessen, so dass die Werte mit und ohne Mutation direkt verglichen werden können.

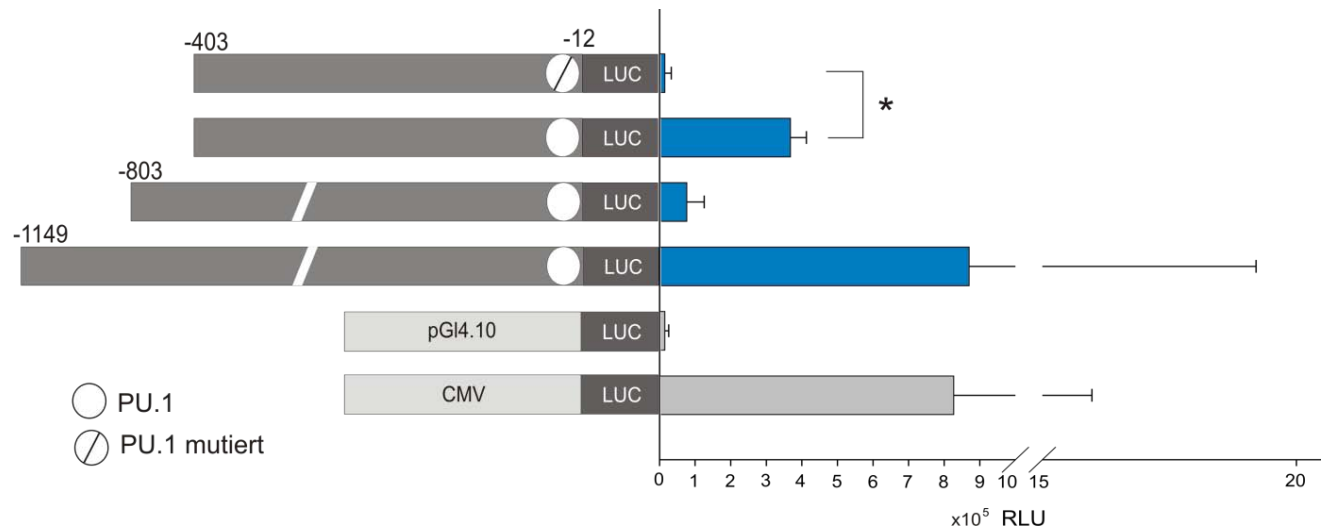


Abb. 16: Luciferasemessung inklusive dem mutierten Konstrukt in RAW264.7

In diesem Diagramm ist das Ergebnis der Luciferasemessung in RAW264.7 dargestellt. Es wurden die in vorhergehenden Messungen aktiven Konstrukte im Vergleich mit dem an der PU.1 Bindestelle mutierten Konstrukt gemessen. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen in denen jeweils Duplikate erstellt wurden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Student's t-test)

Wie in den vorhergehenden Messungen sind die drei Wildtyp Promotorkonstrukte aktiv. Das Konstrukt mit der PU.1 Mutation zeigt keine Aktivität mehr. Die Veränderung der Aktivität des mutierten Konstrukts verglichen mit dem Konstrukt gleicher Länge ohne Mutation ist signifikant mit $p < 0,05$.

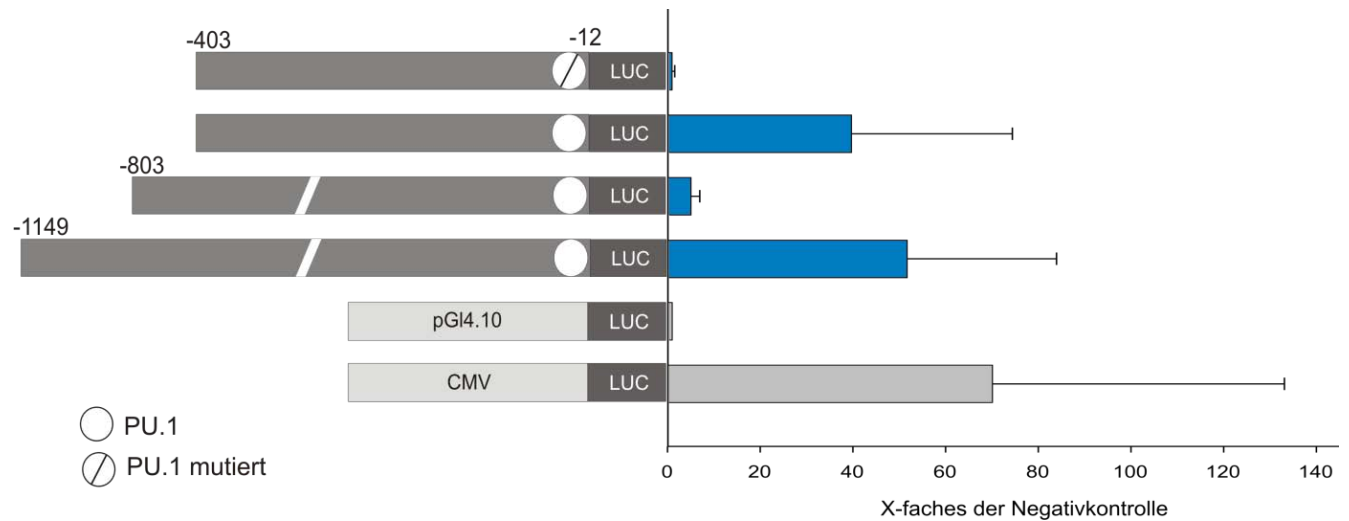


Abb. 17: Auswertung als X-faches der Negativkontrolle in RAW264.7

In dieser Darstellung sind die Messwerte als X-faches der Negativkontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Student's t-test)

In dieser Abbildung ist das in Abb. 16 dargestellte Ergebnis noch einmal in einem Diagramm zusammengefasst. Hier sind die Ergebnisse der Luciferasemessung jeweils als ein Vielfaches der Negativkontrolle (X-fold) dargestellt. Die Aktivitätsminderung nach Mutation der PU.1 Bindestelle lieferte hier kein signifikantes Ergebnis.

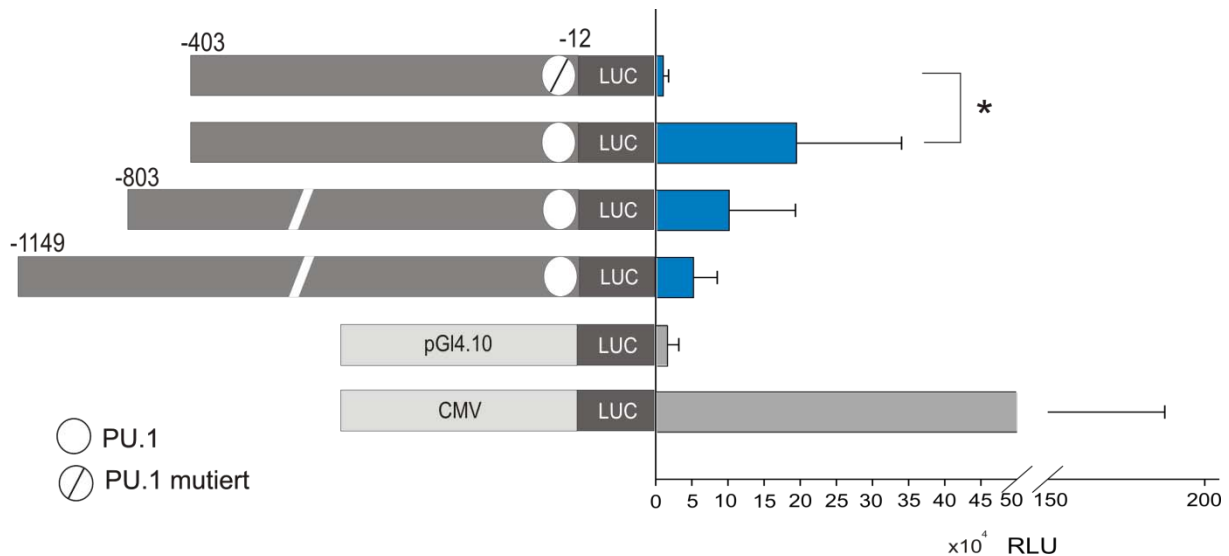


Abb. 18: Luciferasemessung inklusive dem mutierten Konstrukt in BV2

In diesem Diagramm ist das Ergebnis der Luciferasemessung in RAW264.7 dargestellt. Es wurden die in vorhergehenden Messungen aktiven Konstrukte im Vergleich mit dem an der Pu.1 Bindestelle mutierten Konstrukt gemessen. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die Standardabweichung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen in denen jeweils Duplikate erstellt wurden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Student's t-test)

Auch in BV2 Zellen konnte der Effekt gezeigt werden, dass in dem mutierten Konstrukt keine Aktivität mehr vorhanden ist. Wie in vorhergehenden Messungen schon gezeigt sind die anderen drei Promotorkonstrukte aktiv.

Der Rückgang der Aktivität nach Mutation der PU.1 Bindestelle ist hier auf dem 5% Niveau signifikant.

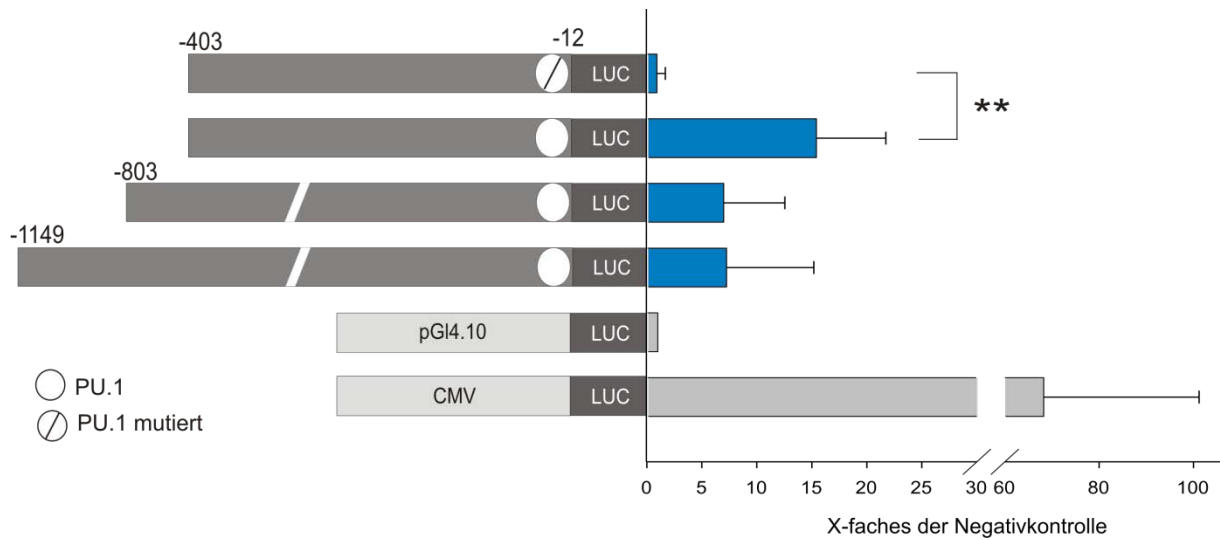


Abb. 19: Auswertung als X-faches der Negativkontrolle in BV2

In dieser Darstellung sind die Messwerte als X-faches der Negativkontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

In diesem Diagramm ist das gleiche Ergebnis wie in Abb. 18 dargestellt. In diesem Fall wurden die erhaltenen Luciferasewerte jeweils als Vielfaches der Negativkontrolle ausgedrückt. Auch hier ist die Verminderung der Aktivität signifikant ($p < 0,01$).

5. Diskussion

Die im Ergebnisteil geschilderten Resultate sollen nun in dieser Diskussion kritisch hinterfragt und in einen Zusammenhang gebracht werden. Durch die Einordnung in ihren Kontext bezüglich Mikroglia Aktivierung soll in der Diskussion auf mögliche weitere Fragestellungen eingegangen werden. Alle Ergebnisse dieser Dissertation wurden in myeloischen Zellen durchgeführt. Es wurden RAW264.7 Zellen, also Makrophagen und anschließend in BV2 Zellen also Mikroglia verwendet. Eine Bestätigung der Ergebnisse in primärer Mikroglia wäre sinnvoll.

5.1 Aktivität der an Position +187 endenden Konstrukte

Diese Konstrukte zeigen wie unter 4.5 in den Graphen Abb. 9 und Abb. 10 gezeigt keine Aktivität. Dies kann prinzipiell zwei Ursachen haben, entweder der Promotor zeigt tatsächlich keine Aktivität oder die Promotorkonstrukte eignen sich für diese Messung nicht. Da in dieser Arbeit gezeigt werden sollte, dass der Promotor aktiv ist, wurde von Letzterem ausgegangen.

Möglicherweise spielte hier eine Rolle, dass die Promotorkonstrukte über den Translationsstartpunkt des Stap-1 Gens hinausgehen. Wie bereits in 4.7 beschrieben konkurriert hier das Ribosom möglicherweise um den Translationsstartpunkt des Promotorkonstrukts und der Luciferase. Trotz aktivierendem Promotor entsteht dann kein funktionsfähiges Protein und es kann mit dem Luciferase Assay keine Lichtemission gemessen werden.

5.2 Aktivität nach stabiler Transfektion

Da nach transienter Transfektion die erstellten Promotorkonstrukte wider Erwarten keine Aktivität zeigten, wurde eine stabile Transfektion durchgeführt. Durch diesen Schritt sollte ausgeschlossen werden, dass die erzielten Messwerte durch ein

schlechtes Transfektionsergebnis oder durch eine zu schnelle Eliminierung der transfizierten DNA aus dem Zellkern zustande gekommen sind.

Die Aktivitäten nach stabiler Transfektion zeigen ein anderes Bild als nach transienter Transfektion. Die Wildtyp Konstrukte zeigen auch nach stabiler Transfektion keine Aktivität, das Ergebnis entspricht der Messung nach transienter Transfektion. Jedoch sind nach der stabilen Transfektion die Messwerte der mutierten Konstrukte besonders hoch. Mit diesem Ergebnis kann ausgeschlossen werden, dass ein ungenügendes Transfektionsergebnis oder eine zu schnelle Eliminierung der transfizierten Konstrukte aus den Zellen zu den niedrigen Luciferasewerten geführt haben. Auch dieses Ergebnis ist möglicherweise durch die oben beschriebene Konkurrenz des Ribosoms um die Translationsstartpunkte des Promotorkonstrukts und der Luciferase zu erklären.

5.3 Aktivität der an Position -12 endenden Konstrukte

Nach der in 5.1 beschriebenen Überlegung schien es sinnvoll, Promotorkonstrukte zu untersuchen, die bereits vor dem Translationsstartpunkt enden. Es wurden drei solche Konstrukte unterschiedlicher Länge kloniert. Die Ergebnisse der Luciferasemessung mit diesen Konstrukten sind unter 4.7 in den Graphen Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt.

Hier zeigte sich nun eine Promotoraktivität. Durch Weglassen der Sequenz des Translationsstartpunktes konnte somit ein funktionierendes System zur Überprüfung der Promotoraktivität von Stap-1 etabliert werden. Mit diesen Promotorkonstrukten konnten nun hohe Luciferasewerte gemessen werden.

Wichtig bei diesem Ergebnis ist hier, dass auch das kleinste Konstrukt -403/-12 aktiv ist. Dieses Ergebnis lässt den Rückschluss zu, dass sich die wichtigen aktivierenden Elemente des Promotors in diesem kurzen Stück befinden.

5.4 Einfluss der LPS-Stimulation

In allen Messungen fällt die Aktivität nach Stimulation mit LPS geringer aus. Dieses Ergebnis ist konträr zu unseren Erwartungen. Durch die LPS Stimulation erwarteten

wir einen Anstieg der Aktivität. Da bereits gezeigt werden konnte, dass unter LPS-Stimulation die mRNA Level ansteigen (Stoecker, Weigelt et al. 2009). Möglicherweise konnte die Reaktion auf die LPS Stimulation in der oben beschriebenen Vorgehensweise nicht adäquat untersucht werden. Sowohl die Transfektion als auch die nachfolgende Stimulation bedeuten Stress für die Zellen. Dieser könnte verantwortlich dafür sein, dass zum Teil Zellen absterben oder weniger Protein bilden. Unter dem Mikroskop konnte jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen den stimulierten und nicht-stimulierten Zellen festgestellt werden, der dafür sprechen würde, dass nach Stimulation eine relevante Menge an Zellen gestorben war. Es waren also nach LPS Stimulation nicht mehr abgelöste, schwimmende Zellen zu sehen, als ohne Stimulation. Es ist vielmehr ein im Labor meiner Arbeitsgruppe bekanntes Problem, dass Promotoren im Luciferase Assay nicht auf LPS ansprechen.

5.5 Einfluss der PU.1 Bindestellen-Mutation

Der Promotor enthält zwei konservierte Bindestellen für den Transkriptionsfaktor PU.1. Da sich eine der beiden Bindestellen hinter dem Translationsstartpunkt befindet, ist sie in den Konstrukten -1149/-12, -814/-12 und -403/-12 nicht mehr enthalten. Die zweite Bindestelle befindet sich an Position -101/-98. Zur Untersuchung des Einflusses dieser Bindestelle auf die Promotoraktivität wurde sie mutiert. Somit war keine Transkriptionsfaktorbindung mehr möglich. Die Aktivität dieses mutierten Konstruktes war sehr viel geringer als die Aktivität ohne Mutation. Die Aktivität liegt im Bereich der Negativkontrolle. Der Unterschied der Aktivität des mutierten Konstrukts zur Aktivität des Wildtyp Konstrukts gleicher Länge war in BV2 Zellen signifikant. In RAW264.7 Zellen konnte in der Auswertung, die alle Werte als X-faches der Negativkontrolle ausdrückt, kein signifikantes Ergebnis erzielt werden, da in diesen Messungen die Negativkontrolle sehr hoch ausgefallen ist.

Insgesamt zeigen die Luciferasemessungen, dass diese Stelle sehr wichtig für die Promotoraktivität ist. Der Transkriptionsfaktor PU.1 spielt für die Expression des Stap-1 Proteins also eine essentielle Rolle.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Modell der Retinoschisis geht der Photorezeptorapoptose eine Aktivierung von Mikroglia voraus (Gehrig, Langmann et al. 2007). *Stap-1* zeigt in aktivierten Mikroglia der RSh1 Knock-Out Maus stark erhöhte Expressionswerte. Ziel dieser Dissertation war den Promotor dieses Gens genauer zu untersuchen, da *Stap-1* ein interessantes Ziel sein könnte um die Aktivierung von Mikroglia zu verstehen und möglicherweise zu beeinflussen bzw. zu limitieren.

Da bereits in einer vorhergehenden Arbeit meiner Arbeitsgruppe (Weigelt, Moehle et al. 2008) gezeigt werden konnte, dass der Makrophagen spezifische Transkriptionsfaktor PU.1 an den *Stap-1* Promotor bindet, wurde in der vorliegenden Arbeit dessen Einfluss auf die Aktivierung der *Stap-1* Transkription betrachtet.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die hauptsächliche Promotoraktivität des *Stap-1* Promotors in einer Region nicht weiter als -400bp vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert ist. Es wurden für diese Untersuchung drei Promotorkonstrukte unterschiedlicher Länge verwendet: -1149/-12, -814/-12, -403/-12. Diese Promotorkonstrukte wurden mittels Luciferase Assay auf ihre Aktivität hin untersucht. Die Luciferase Assays wurden in RAW264.7 Zellen, einer Makrophagen Zelllinie, und in BV2 Zellen, einer mikroglialen Zelllinie, durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass auch das kleinste Promotorkonstrukt zur vollen Aktivierung führt.

Außerdem konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die bereits vorher verifizierte PU.1 Bindestelle wesentlich zur Aktivierung des *Stap-1* Promotors beiträgt. Dazu wurde im kleinsten Promotorkonstrukt die PU.1 Bindestelle mutiert und anschließend noch einmal Luciferase Assays mit diesem mutierten und den anderen drei Wildtyp Konstrukten durchgeführt. Die Aktivität im mutierten Konstrukt war signifikant geringer als im gleich großen Wildtyp-Konstrukt.

Weitere interessante Untersuchungen wären mit einem noch kürzeren Konstrukt, das gerade noch die PU.1 Bindestelle enthält denkbar. Das hieße, das Konstrukt würde bei -110 bp starten. Außerdem wäre es natürlich interessant, den Einfluß der zweiten PU.1 Bindestelle zu untersuchen. Dazu müsste man neue Konstrukte klonieren, die über den Translationsstartpunkt hinausgehen. Messungen mit solchen Konstrukten

scheiterten in dieser Arbeit, hier müsste der Endpunkt des Konstruktes genau überlegt werden.

Zur Gewinnung genauerer Kenntnisse über Stap-1, die Aufschluss darüber geben könnten, ob ein Eingriff in die Expression dieses Gens ein therapeutischer Angriffspunkt werden kann, würde sich die Untersuchung eines Stap-1 Knock-Out Modells anbieten.

Literaturverzeichnis

- Blasi, E., R. Barluzzi, et al. (1990). "Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus." J Neuroimmunol 27(2-3): 229-37.
- Chitu, V. and E. R. Stanley (2006). "Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation." Curr Opin Immunol 18(1): 39-48.
- Copland, D. A., C. J. Calder, et al. (2007). "Monoclonal antibody-mediated CD200 receptor signaling suppresses macrophage activation and tissue damage in experimental autoimmune uveoretinitis." Am J Pathol 171(2): 580-8.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, et al. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol 7(2): 725-37.
- Dick, A. D. (2009). "Influence of microglia on retinal progenitor cell turnover and cell replacement." Eye (Lond) 23(10): 1939-45.
- Gehrig, A., T. Langmann, et al. (2007). "Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development." Invest Ophthalmol Vis Sci 48(2): 891-900.
- Hume, D. A., X. Yue, et al. (1997). "Regulation of CSF-1 receptor expression." Mol Reprod Dev 46(1): 46-52; discussion 52-3.
- Kellner, U., S. Brummer, et al. (1990). "X-linked congenital retinoschisis." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 228(5): 432-7.
- Langmann, T. (2007). "Microglia activation in retinal degeneration." J Leukoc Biol 81(6): 1345-51.
- Lodie, T. A., R. Savedra, Jr., et al. (1997). "Stimulation of macrophages by lipopolysaccharide alters the phosphorylation state, conformation, and function of PU.1 via activation of casein kinase II." J Immunol 158(4): 1848-56.
- Masuhara, M., K. Nagao, et al. (2000). "Molecular cloning of murine STAP-1, the stem-cell-specific adaptor protein containing PH and SH2 domains." Biochem Biophys Res Commun 268(3): 697-703.
- Mitrasinovic, O. M., V. A. Vincent, et al. (2003). "Macrophage colony stimulating factor promotes phagocytosis by murine microglia." Neurosci Lett 344(3): 185-8.
- Murnane, J. P., M. J. Yezzi, et al. (1990). "Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells." Nucleic Acids Res 18(9): 2733-8.

- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, et al. (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." Science 308(5726): 1314-8.
- Ohya, K., S. Kajigaya, et al. (1999). "Molecular cloning of a docking protein, BRDG1, that acts downstream of the Tec tyrosine kinase." Proc Natl Acad Sci U S A 96(21): 11976-81.
- Pixley, F. J. and E. R. Stanley (2004). "CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action." Trends Cell Biol 14(11): 628-38.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning : a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sauer, C. G., A. Gehrig, et al. (1997). "Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis." Nat Genet 17(2): 164-70.
- Scott, E. W., M. C. Simon, et al. (1994). "Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages." Science 265(5178): 1573-7.
- Sekine, Y., S. Tsuji, et al. (2007). "Signal-transducing adaptor protein-2 regulates integrin-mediated T cell adhesion through protein degradation of focal adhesion kinase." J Immunol 179(4): 2397-407.
- Sekine, Y., T. Yumioka, et al. (2006). "Modulation of TLR4 signaling by a novel adaptor protein signal-transducing adaptor protein-2 in macrophages." J Immunol 176(1): 380-9.
- Stoecker, K., K. Weigelt, et al. (2009). "Induction of STAP-1 promotes neurotoxic activation of microglia." Biochem Biophys Res Commun 379(1): 121-6.
- Streit, W. J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS." Glia 40(2): 133-9.
- Takada, Y., C. Vijayasarathy, et al. (2008). "Synaptic pathology in retinoschisis knockout (Rs1-/y) mouse retina and modification by rAAV-Rs1 gene delivery." Invest Ophthalmol Vis Sci 49(8): 3677-86.
- Tambuyzer, B. R., P. Ponsaerts, et al. (2009). "Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology." J Leukoc Biol 85(3): 352-70.
- Trepel, M. (2008). Neuroanatomie, Struktur und Funktion, Urban und Fischer.
- Weber, B. H., H. Schrewe, et al. (2002). "Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rs1h, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure." Proc Natl Acad Sci U S A 99(9): 6222-7.
- Weber, B. H. F., S. Janocha, et al. (1995). "X-linked juvenile retinoschisis (RS) maps between DXS987 and DXS443." Cytogenet Cell Genet 69(1-2): 3.

- Weigelt, K., W. Ernst, et al. (2007). "Dap12 expression in activated microglia from retinoschisin-deficient retina and its PU.1-dependent promoter regulation." J Leukoc Biol 82(6): 1564-74.
- Weigelt, K., C. Moehle, et al. (2008). "An integrated workflow for analysis of ChIP-chip data." Biotechniques 45(2): 131-2, 134, 136 passim.
- Yokohari, K., Y. Yamashita, et al. (2001). "Isoform-dependent interaction of BRDG1 with Tec kinase." Biochem Biophys Res Commun 289(2): 414-20.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BRDG	BCR downstream signaling
bzw	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CSF	Colony stimulating factor
d	Schichtdicke
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
F	<i>forward</i>
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fötale Rinderserum (<i>fetal calve serum</i>)
g	Gramm
h	Stunde(n) (hour)
IFN	Interferon
kb	Kilobasen
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M-CSF	Macrophage –colony stimulating factor

MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute(n)
Mm	Maus (Mus Musculus)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
n	Nano
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PU.1	Purine rich box 1
R	reverse
RLU	Relative Lichteinheiten (relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RS	Retinoschisin
RT	Raumtemperatur
SCF	Stem cell factor
sec	Sekunden
Stap	Stem-cell adaptor protein
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
U	Umdrehungen
ÜN	Über Nacht
wt	wildtyp
XLRS	X- gekoppelte Retinoschisis (<i>X-linked retinoschisis</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem
ε	Extinktionskoeffizient

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der Retina	2
Abb. 2: konservierte PU.1 Bindestellen	32
Abb. 3: Sequenz des Stap-1 Promotors	34
Abb. 4: Agarosegel der PCR-Produkte	34
Abb. 5: Agarosegel des geschnittenen Vektors pGL4.10.....	35
Abb. 6: Agarosegel des Kontrollverbaus mit Konstrukt 4	36
Abb. 7: Agarosegel des Kontrollverbaus mit den Konstrukten 2 und 3.....	37
Abb. 8: Darstellung der PU.1 Bindestellen im Stap-1 Promotor	38
Abb. 9: Diagramm der Luciferasemessung der 6 Promotorkonstrukte in RAW264.7 Zellen..	40
Abb. 10: Diagramm der Luciferasemessung der 6 Promotorkonstrukte in BV2 Zellen	41
Abb. 11: Diagramm der Luciferasemessung nach stabiler Transfektion in BV2	42
Abb. 12: Diagramm der Luciferasemessung in RAW	44
Abb. 13: Diagramm der Luciferasemessung in BV2	46
Abb. 14: Sequenz des kleinsten Promotorkonstrukts (-403/-12)	47
Abb. 15: Sequenzierung der Mutation	48
Abb. 16: Luciferasemessung inklusive dem mutierten Konstrukt in RAW264.7.....	49
Abb. 17: Auswertung als X-faches der Negativkontrolle in RAW264.7.....	50
Abb. 18: Luciferasemessung inklusive dem mutierten Konstrukt in BV2.....	51
Abb. 19: Auswertung als X-faches der Negativkontrolle in BV2.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Organismen und Zellen	11
Tabelle 2: verwendete Primer	12
Tabelle 3: verwendetes Plasmid	12
Tabelle 4: verwendete Kit-Systeme und Enzyme	12
Tabelle 5: verwendete Chemikalien	13
Tabelle 6: verwendete Medien	13
Tabelle 7: verwendete Puffer und Lösungen	14
Tabelle 8: verwendete Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 9: genutzte Geräte	15
Tabelle 10: genutzte Software	16
Tabelle 11: Darstellung der Genexpression	31

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Langmann für die Überlassung dieses spannenden Themas. Bedanken möchte ich mich auch für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Humangenetik.

Prof. Dr. Thomas Langmann hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Er war stets bereit auftretende Probleme zu diskutieren und gemeinsam zu lösen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Weber für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit an seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. Christian Hengstenberg danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dank gebührt auch Yana Walczak, Marcus Karlstetter, Stephanie Ebert, Karin Weigelt und den übrigen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die angenehme Atmosphäre im Labor und die gute Zusammenarbeit. Jeder von ihnen war stets hilfsbereit, wenn es um die Lösung von Fragen und Problemen ging.

Besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir das Medizinstudium ermöglicht und wesentlich dazu beigetragen hat, dass ich die Arbeit zu einem guten Abschluss bringen konnte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Claudia Harpaintner, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den aufgelisteten Hilfsmitteln erstellt zu haben.

Regensburg, den 22.11.2011

Claudia Harpaintner

Lebenslauf

Persönliche Daten

Claudia Harpaintner
geboren am 01.09.1985 in Landshut
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1992-1995	Grundschule Mirskofen
1995-2005	Hans-Leinberger-Gymnasium Landshut

Studium

2005-2007	Vorklinischer Studienabschnitt an der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg
2007-2011	Klinischer Studienabschnitt am Klinikum der Universität Regensburg